

Domänen des Kapsidproteins L2 humanpathogener Papillomviren für die Interaktion mit viralen und zellulären Bindungspartnern

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Katrin Anne Becker
geboren 1976 in Mainz

Mainz, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Abteilung Molekulare Genetik angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. August 2004

Veröffentlichungen

Becker, K. A.; L. Florin; C. Sapp; M. Sapp (2003)

Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization

Virology **314**: 161-167

Becker, K. A.; L. Florin; C. Sapp; G. G. Maul; M. Sapp (2004)

Nuclear Localization but Not PML Protein Is Required for Incorporation of the Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 into Virus-Like Particles

J. Virol. **78**(3): 1121-1128

Florin, L.; K. A. Becker; C. Sapp; C. Lambert; H. Sirma; M. Müller; R. E. Streeck; M. Sapp (2004)

Nuclear Translocation of Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 Requires Hsc70

J. Virol. **78**(11): 5546-5553

Kongresse

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Kongressen als Poster oder in Vorträgen vorgestellt:

20th International Papillomavirus Conference 2002, Paris (Frankreich)

Jahrestagung 2003 der Gesellschaft für Virologie, Berlin

EMBO Workshop „The Structural Biology of Small DNA Tumor Viruses“ 2003, Siena, (Italien)

21th International Papillomavirus Conference 2004, Mexiko City (Mexiko)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Papillomviren	1
1.1.1	Die genetische Organisation der Papillomviren.....	1
1.1.2	Die Kapsidstruktur.....	4
1.1.3	Der Infektionszyklus	5
1.2	Der Kern und Kernstrukturen.....	6
1.2.1	Die ND10.....	7
1.2.2	ND10 als Orte viraler Replikation und Transkription.....	12
1.3	Viren und ihre Assoziation zu Chaperonen.....	12
1.4	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Geräte und Labormaterialien.....	16
2.1.2	Fertigreagenzien	17
2.1.3	Enzyme und Medien.....	17
2.1.4	Antikörper.....	18
2.1.5	Zell-Linien.....	19
2.1.6	Mutagenese-Primer.....	20
2.1.7	Vektoren.....	21
2.1.8	Protein- und DNA-Marker.....	21
2.1.9	Lösungen	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Arbeiten mit DNA.....	23
2.2.2	Arbeiten mit RNA.....	25
2.2.3	Kultivierung von Säugerzellen.....	25
2.2.4	Expression von Proteinen im Vacciniavirus-System.....	26
2.2.5	Präparation von Proteinen.....	29
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Die ND10-Assoziation von L2.....	35
3.1.1	Identifizierung der ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD).....	35
3.1.2	Charakterisierung der NDLD (Punktmutagenese).....	37
3.1.3	L2-Lokalisation in PML-negativen Zellen.....	40
3.2	Die L2-induzierte ND10-Reorganisation	41
3.2.1	L2-induzierter Sp100-Ausschluss aus ND10	41
3.2.2	Interaktion von L2 mit dem Daxx-Protein	44
3.3	Die Interaktion von L2 mit dem Kapsidprotein L1	50
3.3.1	L2-induzierte Rekrutierung von L1 in ND10	51
3.3.2	L2-Einbau in virusähnliche Partikel (VLPs)	52
3.3.3	Mutagenese des HPV11 L1-Interaktionsmotivs.....	55
3.3.4	L1/L2-Interaktion in PML-negativen Zellen.....	56
3.3.5	L1/L2-Interaktion in Daxx-negativen Zellen	59
3.3.6	Analyse der L1/L2-Interaktion im Cytoplasma	60
3.4	Die Interaktion von L2 mit dem Chaperon Hsc70	62
3.4.1	Cytoplasmatische Retention von L2 durch den Proteasomen-Inhibitor MG132.....	62

3.4.2	Der C-Terminus von L2 wird vor dem Kerntransport nicht abgespalten	63
3.4.3	Hsc70 wird mit L2 in den Kern transportiert	64
3.4.4	Hsc70 wird in VLPs, nicht aber in Pseudovirionen eingebaut	65
3.5	Die Mikrotubuli-Assoziation von L2 nach MG132-Behandlung	66
3.5.1	Kolokalisation von L2 und α -Tubulin unter MG132-Einfluss	66
3.5.2	Nocodazol hebt den MG132-Effekt auf	67
4	Diskussion	69
4.1	Die Lokalisation von L2 im Kern	69
4.1.1	Die ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD)	69
4.1.2	L2 bildet unabhängig von PML Kernaggregate	71
4.1.3	Die Reorganisation von ND10	73
4.2	Die Interaktion der Kapsidproteine L1 und L2	76
4.2.1	L1 und L2 interagieren unabhängig von PML miteinander	76
4.2.2	Der L2-Einbau in VLPs erfordert die Kernlokalisierung von L1 und L2	77
4.2.3	L2 besitzt mindestens zwei L1-Interaktionsdomänen	78
4.3	Hsc70 wird für den Kerntransport von L2 benötigt	79
4.3.1	L2 interagiert mit Hsc70	79
4.3.2	In Hsc70-Abwesenheit interagiert L2 mit Mikrotubuli	80
4.3.3	Hsc70 wird in L1/L2-VLPs, nicht aber in Pseudovirionen eingebaut	82
4.4	Ein Arbeitsmodell	83
5	Zusammenfassung und Ausblick	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Abkürzungsverzeichnis	103

1 Einleitung

1.1 Papillomviren

Papillomviren sind Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom von ca. 8.000 Basenpaaren, das mit zellulären Histonen assoziiert als Minichromosom vorliegt [Howley and Lowy 2001]. Papillomviren verursachen beim Menschen und bei zahlreichen anderen Wirbeltieren wie Affen, Hunden, Schafen, Rindern und Elchen Warzen der Haut und Schleimhaut (Papillome). Sie haben eine stark ausgeprägte Wirts- und Gewebespezifität. Sie sind strikt epitheliotrop, d. h. sie infizieren basale Epithelzellen und können sich nur in enddifferenzierten Keratinocyten replizieren. Daher kann man sie bisher nicht *in vitro* züchten. Inzwischen sind schon über 100 humane Papillomvirustypen (HPV-Typen) identifiziert [de Villiers 1997]. Die Einteilung der verschiedenen Virustypen erfolgt anhand der Sequenzmerkmale. So muss ein neuer Virustyp mindestens 10 % Sequenzunterschied hinsichtlich der Basenabfolge in den offenen Leserahmen von E6, E7 und L1 aufweisen [Delius and Hofmann 1994; Chan et al. 1995]. Die HPV-Typen unterscheiden sich auch hinsichtlich der durch sie verursachten Krankheiten. Kutane HPV-Typen infizieren die Haut und verursachen gutartige Wucherungen (HPV1 und HPV2) oder bösartige Läsionen (HPV5 und HPV8). Mukosale HPV-Typen wiederum sind beschränkt auf innere Epithelien des oralen oder anogenitalen Gewebes. Auch hier kann zwischen gutartigen Epithelneubildungen (HPV6 und HPV11) und malignen Tumoren unterschieden werden. Die häufigste mit HPV assoziierte Krebsform ist das Cervixkarzinom, an dem jährlich ca. 500.000 Frauen erkranken [Shah and Howley 1996]. In Ländern der Dritten Welt stellt das Cervixkarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen dar, weltweit immerhin die zweithäufigste. Die typischen HPV-Typen, die mit dem Cervixkarzinom assoziiert sind, sind HPV16, -18, -31, -33, -35, -45 und -58.

1.1.1 Die genetische Organisation der Papillomviren

Die genetische Organisation der einzelnen Papillomviren ist sehr gut konserviert [Howley 1996]. Alle offenen Leserahmen der Gene liegen auf demselben DNA-Strang. Das Genom lässt sich in drei Regionen unterteilen: zunächst in eine nicht-kodierende Region (NCR) mit Replikationsursprung [Chow and Broker 1994], mehreren Promotoren und Transkriptions-Enhancer-Elementen [Fuchs and Pfister 1994]. Daran schließt sich die sog. frühe Region an, die alle Gene für die Etablierung des viralen Genoms enthält.

Durch eine Polyadenylierungsstelle wird die sog. späte Region abgetrennt, die für die Kapsidproteine L1 und L2 kodiert (Abb.1).

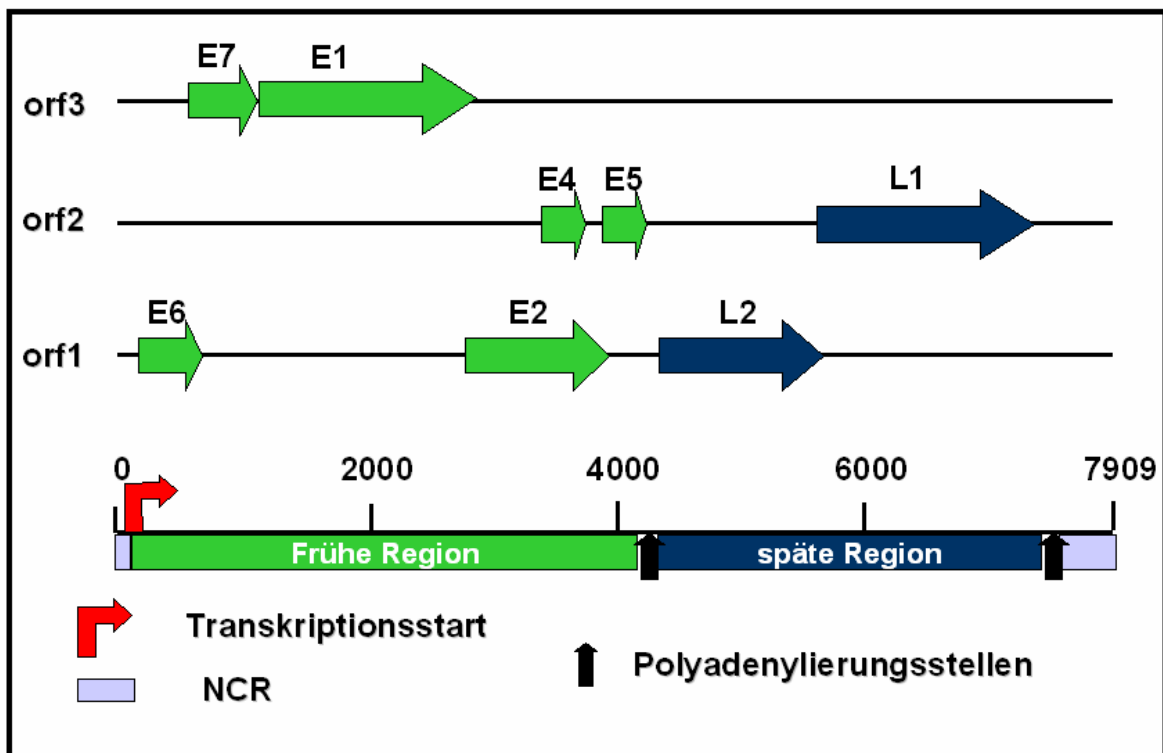


Abb. 1: Die Genomorganisation von HPV33

Die offenen Leserahmen (orf), die für die frühen und späten Gene kodieren, liegen auf einem DNA-Strang, jedoch in drei verschiedenen Leserahmen. Zwischen der frühen und späten Region befindet sich ein nicht-kodierender Bereich (NCR) mit verschiedenen Kontrollelementen. Vereinfacht wurde das zirkuläre Genom linear dargestellt (nach Cole und Streeck, 1986).

1.1.1.1 Die frühen Proteine

In der frühen Genomregion von HPV befinden sich sechs offene Leserahmen für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 (E für *early*). Ein E3-Protein ist bisher noch nicht identifiziert worden. E4-Expression findet man spät während des Replikationszyklus, wenn die späten Proteine synthetisiert werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Funktionen der E-Proteine.

Protein	Molekulargewicht	Lokalisation	Funktion
E1	68-85 kD	Zellkern	Initiation und Elongation der Replikation, Helikaseaktivität [Clertant and Seif 1984; Ustav and Stenlund 1991; Li and Botchan 1993; Seo et al. 1993]; wirkt zusammen mit der zellulären Replikationsmaschinerie [Park et al. 1994]; interagiert mit E2 [Mohr et al. 1990; Seo et al. 1993; Sedman and Stenlund 1995]
E2	48 kD	Zellkern	Initiation der DNA-Replikation, Transaktivator/-repressor [Lambert et al. 1989] Regulation der E5-, E6- und E7-Expression [zur Hausen 1999]
E4	ca. 11 kD	Cytoplasma	unklar Interaktion mit und Abbau des Keratingerüsts [Doorbar et al. 1991; Roberts et al. 1993]
E5	ca. 5kD	Cytoplasma-Membran, ER und Golgi	immortalisierend, u. a. indirekte Interaktion mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF [Conrad et al. 1993; Straight et al. 1993]
E6	ca. 16 kD	Cytoplasma	immortalisierend, u. a. Interaktion mit p53, Induktion des proteolytischen p53-Abbaus [Scheffner et al. 1990; Mantovani and Banks 1999]
E7	ca. 10 kD	Zellkern	immortalisierend, u. a. Interaktion mit Tumorsuppressor pRb u. a.; Aktivierung von Genen, die Zell-Eintritt in S-Phase induzieren [Zerfass et al. 1995; Chow and Broker 1997]

Tab. 1: Die E-Proteine und einige ihrer Funktionen

Nicht in allen Fällen kann die Funktion der einzelnen Proteine auf alle HPV-Typen übertragen werden, was zum Teil auf unterschiedliche Interaktionspartner oder Wirkmechanismen der E-Proteine in den verschiedenen Zelltypen zurückzuführen ist. Da E4 das am wenigsten konservierte Protein darstellt und zudem viele unterschiedliche mRNA-Spezies dafür kodieren, ist die Aufklärung seiner Funktion zusätzlich erschwert.

1.1.1.2 Die späten Proteine

Wie schon erwähnt, werden die beiden Kapsidproteine L1 und L2 durch Gene in der späten Region kodiert (L für *late*). Die auf den ersten Blick rein strukturellen Proteine werden im Verlauf der Infektion erst spät in den oberen Epithelschichten exprimiert [Stoler *et al.* 1990]. L1 bildet den Hauptbestandteil der Viruskapside und besteht aus ca. 500 Aminosäuren, deren Sequenz bei allen HPV-Typen hochkonserviert ist [Favre 1975; Gissmann *et al.* 1977]. Heterologe Expression des Kapsidproteins in eukaryotischen Zellen resultiert im spontanen Zusammenbau von virusähnlichen Partikeln (VLPs) [Kirnbauer *et al.* 1992; Hagensee *et al.* 1993; Rose *et al.* 1993; Volpers *et al.* 1994]. Dieser Zusammenbau kann auch im Cytoplasma stattfinden [Paintsil *et al.* 1996] und funktioniert sogar *in vitro* [Kawana 1998; Touze and Coursaget 1998; White *et al.* 1998]. L2 ist ein Protein mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie L1, das jedoch ein abweichendes elektrophoretisches Laufverhalten von ca. 75 kD zeigt [Komly *et al.* 1986; Volpers *et al.* 1994]. Es besitzt außer den strukturellen Aufgaben im Kapsid zahlreiche Funktionen im Infektionsprozess und der DNA-Verpackung [Zhou *et al.* 1994; Roden *et al.* 1996; Unckell *et al.* 1997; Stauffer *et al.* 1998]. Es lokalisiert in speziellen Kerndomänen, den sog. ND10 (*nuclear domain 10*), wo auch E1 und E2 zu finden sind [Swindle *et al.* 1999], und kann L1 dorthin rekrutieren [Day *et al.* 1998; Florin *et al.* 2002a]. Bei Koexpression von L1 und L2 wird L2 in Kapside eingebaut.

1.1.2 Die Kapsidstruktur

Das HPV-Kapsid aus L1 und L2 hat einen Durchmesser von ca. 55 nm und weist eine ikosaedrische Symmetrie auf (Abb. 2). 360 L1-Moleküle bilden 72 Pentamere, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [Sapp *et al.* 1995; Li *et al.* 1998; Sapp *et al.* 1998]. Zwölf dieser Kapsomere sind pentavalent, d. h. von fünf weiteren Kapsomeren umgeben, die restlichen 60 Kapsomere dagegen sind hexavalent. Nicht-kovalente Wechselwirkungen durch den DNA- und L2-Einbau stabilisieren das Kapsid zusätzlich [Doorbar and Gallimore 1987; Sapp *et al.* 1995; Fligge *et al.* 2001]. Das L2-Protein ist nur mit zwölf Kopien in der Virushülle vertreten. Es wird vermutet, dass die L2-Moleküle zentral in den zwölf pentavalenten Kapsomeren sitzen [Trus *et al.* 1997]. Viele Untersuchungen der Kapside beschränken sich auf artifizielle Systeme, da die Virionen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Für cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen kommen v. a. leere virusähnliche Partikel (VLPs) zum Einsatz, die entweder nur aus L1 oder beiden Kapsidproteinen aufgebaut sind [Zhou *et al.* 1991; Kirnbauer *et*

al. 1992; Rose *et al.* 1993; Hagensee *et al.* 1994; Volpers *et al.* 1994; Hofmann *et al.* 1995; Sasawaga *et al.* 1995; Li *et al.* 1997]. Für Analysen des Infektionsweges von HPV greift man stattdessen auf Pseudovirionen zurück, die ein Marker-Plasmid enthalten. Die Infektion von Zellen kann somit in Zellkulturversuchen leicht nachvollzogen werden.

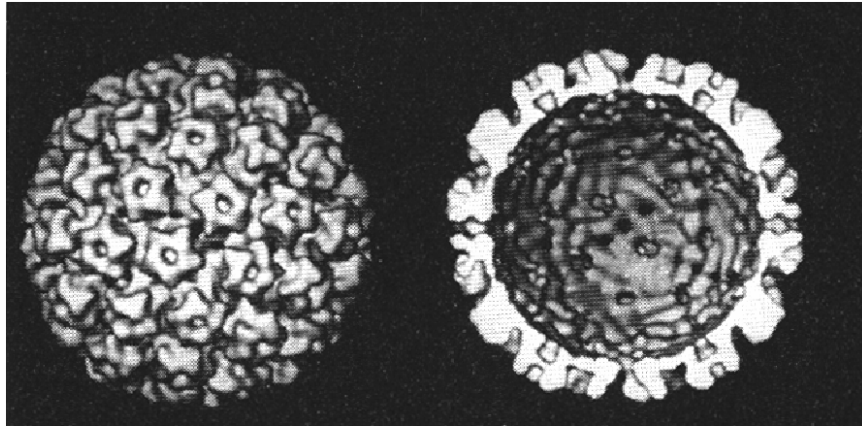


Abb. 2: Das Papillomvirus-Kapsid

Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Bildrekonstruktion cryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen von HPV1-Virionen. Die Kapsomere sind als sternförmige Strukturen zu erkennen; rechts ein Querschnitt durch das Kapsid.

1.1.3 Der Infektionszyklus

Der produktive Lebenszyklus von Papillomviren ist eng mit den Differenzierungsstadien der Epithelien von Haut und Schleimhaut verbunden (Abb. 3). Die Viren infizieren undifferenzierte Epithelzellen in den basalen Hautschichten, wobei diese durch offene Wunden oder Mikroläsionen zugänglich sein müssen [Chow and Broker 1997]. Papillomviren können an unterschiedliche eukaryotische Zellen binden [Müller *et al.* 1995; Volpers *et al.* 1995; Unckell *et al.* 1997]. Man geht deshalb davon aus, dass es sich bei dem Rezeptor um ein sehr häufiges und hochkonserviertes Oberflächenmolekül handelt. Die Aufnahme der Partikel erfolgt durch Endocytose. Das virale Genom gelangt in den Zellkern und wird dort zunächst zellzyklus-unabhängig amplifiziert. Bei mitotischer Teilung der infizierten Zelle etabliert sich die DNA in beiden Tochterzellen. In den infizierten Zellen ist die Differenzierung deutlich verzögert und die infizierten Stammzellen zeigen erhöhte Proliferation, vermutlich primär durch die Wirkung der transformierenden Proteine E5, E6 und E7 [Stoler 2000; Howley and Lowy 2001]. Dadurch kommt es zur Verdickung der Epithelschicht. Mit fortschreitender Differenzierung der Epithelzellen finden in den oberen Schichten die Amplifikation der viralen DNA und die Expression der Kapsidproteine statt und es kommt zum Zusammenbau der fertigen Virionen. Diese werden durch Abschuppung der Zellen in

der oberen Epidermis freigesetzt. Mit Hilfe aufwändiger Systeme, bei denen undifferenzierte Keratinocyten auf Kollagenschichten aufgebracht werden, konnte inzwischen erstmals der gesamte Lebenszyklus von HPV31b *in vitro* nachgestellt werden. An der Grenzschicht zwischen Luft und Flüssigkeit kommt es zur Differenzierung der Zellen wie in „normalem“ Epithelgewebe [Meyers *et al.* 1992].

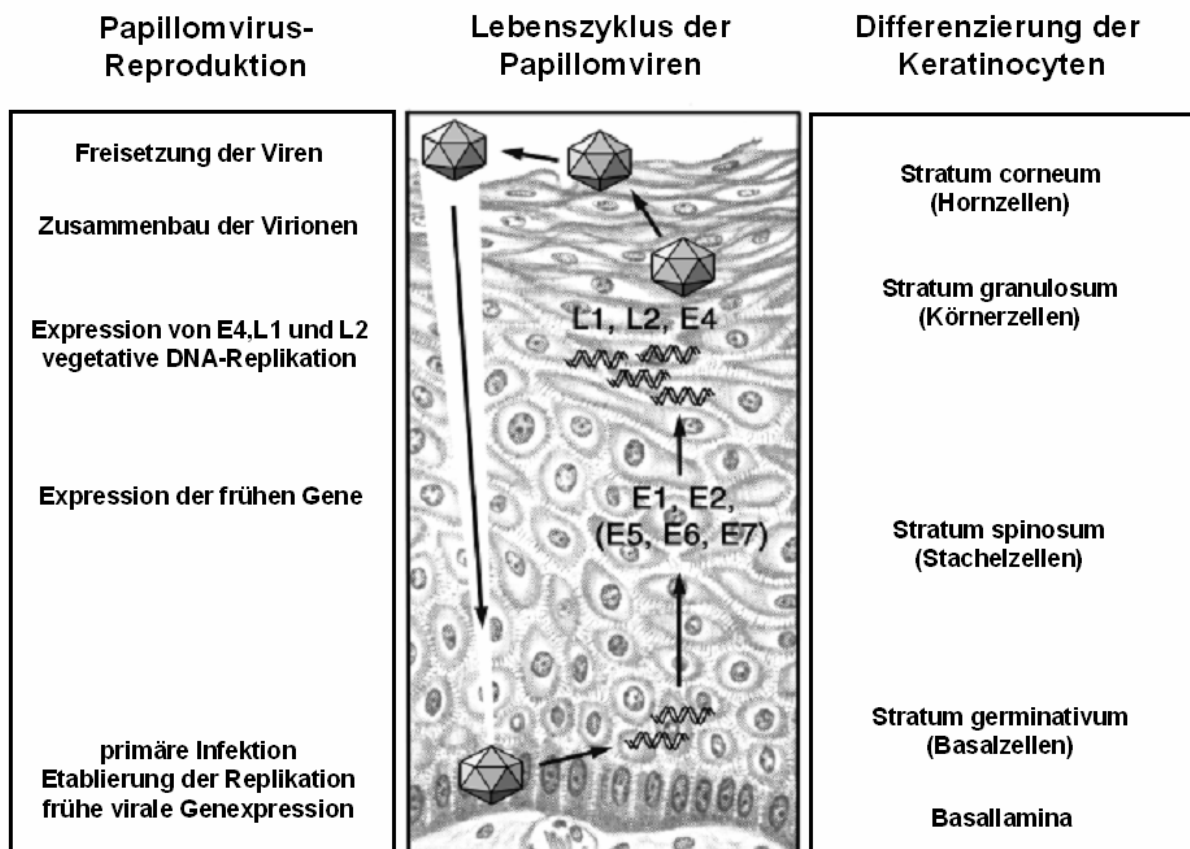


Abb. 3: Der Infektionszyklus von Papillomviren

Schematische Darstellung der Epidermisschicht und der damit verbundenen Stadien des reproduktiven Infektionszyklus' von Papillomviren.

1.2 Der Kern und Kernstrukturen

Der Zellkern wurde schon im Jahr 1802 durch Franz Bauer entdeckt und war die erste intrazelluläre Struktur, die beschrieben wurde. Der Zellkern wird seitdem mit großer Faszination untersucht, sei es wegen seines komplexen Verhaltens während der Zellteilung oder aufgrund seiner Rolle in der Vererbung [Harris 1999]. Die Forschungsversuche gestalteten sich zunächst schwierig, da die mikroskopischen Untersuchungsmöglichkeiten noch eingeschränkt waren. Erst in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bewiesen werden, dass der Zellkern aus morphologisch klar zu unterscheidenden Strukturen

besteht [Spector 1993]. Im Laufe der Zeit wuchs die Zahl neu entdeckter Kern-Kompartimente [Dundr and Misteli 2001], und es gelang, den einzelnen Kern-Organellen Aufgaben zuzuweisen [Lamond and Earnshaw 1998]. Es stellte sich heraus, dass der Zellkern eine sehr dynamische Komponente ist. Die untersuchten Kernstrukturen weisen schnellen Protein-Austausch mit dem Nukleoplasma auf [Misteli 2001]. Die am besten untersuchten Kernstrukturen sind die Nukleoli [Scheer and Hock 1999; Carmo-Fonseca *et al.* 2000; Olson *et al.* 2000], die Spleiß-Faktor-Kompartimente (SFC) [Misteli 2001], die Cajal-Körper (CB) [Gall 2000], die ND10 und eine wachsende Anzahl an kleinen punktförmigen Kernkörpern [Matera 1999]. Mit Ausnahme der Nukleoli und der SFC sind die Funktionen der weiteren Kerndomänen nicht klar oder umstritten.

1.2.1 Die ND10

Gut untersuchte Kernstrukturen sind die ND10 [Ascoli and Maul 1991]. Sie erhielten ihren Namen, da im Durchschnitt zehn dieser Domänen mit einem Durchmesser von 0,3 bis 0,5 μm im eukaryotischen Zellkern vertreten sind. Die genaue Zahl variiert je nach Zelltyp und ist zudem zellzyklusabhängig [Koken *et al.* 1995; Terris *et al.* 1995]. ND10 sind auch unter den Namen PODs (PML oncogenic domains) [Dyck *et al.* 1994], PML-Körper oder Kremer-Körper (KB) [Weis *et al.* 1994] bekannt. Entdeckt wurden die ND10 als Zielorte von Auto-Antigenen in Patienten mit primärer Gallenzirrhose [Szostecki *et al.* 1990]. Immer mehr Proteine werden identifiziert, die permanent oder transient mit ND10 assoziiert sind. Unter diesen Proteinen befinden sich u. a. PML [Dyck *et al.* 1994; Koken *et al.* 1994; Weis *et al.* 1994], Sp100 [Szostecki *et al.* 1990], Daxx [Ishov *et al.* 1999], CBP [Boisvert *et al.* 2000; Boisvert *et al.* 2001], NDP52 [Korioth *et al.* 1995; Sternsdorf *et al.* 1997c], NDP55 [Ascoli and Maul 1991], Retinoblastom-Tumorsuppressor pRb [Alcalay *et al.* 1998] und BML [Neff *et al.* 1999].

Das promyelocytische Leukämie-Protein (PML) ist die Hauptstrukturkomponente der ND10 [Ishov *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000a]. Es wurde als Fusionsprotein mit dem Retinsäure-Rezeptor α (RAR) in Zelllinien identifiziert, die von Patienten mit akuter promyelocytischer Leukämie (APL) stammten [de The *et al.* 1990; Goddard *et al.* 1991; Kakizuka *et al.* 1991]. PML ist ein Phosphoprotein, das wie einige andere Proteine durch das Ubiquitin-ähnliche Molekül SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier*) an bestimmten Lysin-Resten modifiziert werden kann [Boddy *et al.* 1996; Sternsdorf *et al.* 1997b; Kamitani *et al.* 1998; Muller *et al.* 1998; Duprez *et al.* 1999]. Durch verschiedene Spleißvarianten des PML-Gens kommt das PML-Protein in unterschiedlichen

Molekulargewichten vor [Goddard *et al.* 1991; Fagioli *et al.* 1992; Kastner *et al.* 1992; Sternsdorf *et al.* 1997a; Jensen *et al.* 2001; Reymond *et al.* 2001]. Es liegt in löslicher und unlöslicher Form vor, und man nimmt an, dass die SUMO-1-Modifikation von PML entscheidend für seine Anwesenheit in ND10 und somit für den Aufbau dieser Domänen ist [Muller *et al.* 1998; Duprez *et al.* 1999; Ishov *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000a]. Der Aufbau geschieht vermutlich durch Multimerisierung der im PML-Protein vorhandenen RING-Motive [Kentsis *et al.* 2002]. Ob PML tatsächlich SUMO-1-modifiziert vorliegen muss, um ND10 aufzubauen, wird kontrovers diskutiert [Ishov *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000a; Lallemand-Breitenbach *et al.* 2001]; evtl. spielen dafür zusätzlich oder stattdessen Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen eine Rolle [Everett *et al.* 1999]. Man geht aber davon aus, dass die SUMO-1-Modifikation von PML ausschlaggebend für die Rekrutierung weiterer ND10-Komponenten ist [Ishov *et al.* 1999]. Eine ständig wachsende Anzahl an Proteinen zeigt ND10-Assoziation [Seeler and Dejean 1999]. Eine eindeutige Funktion konnte PML bisher nicht zugewiesen werden. Verschiedene funktionelle Untersuchungen beschreiben PML als transkriptionellen Repressor [Mu *et al.* 1994; Vallian *et al.* 1997], als Wachstums- und Transformationssuppressor [Mu *et al.* 1994; Koken *et al.* 1995; Terris *et al.* 1995] und antivirales Protein [Chelbi-Alix *et al.* 1998]. PML scheint durch die Interaktion mit anderen Proteinen wie z. B. Transkriptions-Faktoren und ihrer Rekrutierung in ND10 eine Kontrollfunktion im Kern auszuüben [Li *et al.* 2000a; Lehembre *et al.* 2001; Wu *et al.* 2001].

Fehlt das PML-Protein wie in PML^{-/-}-Zellen oder liegt es wie in APL als Fusionsprotein vor, so kommt es zu der vollständigen Zerstörung bzw. Auflösung der ND10 [Wang *et al.* 1998; Zhong *et al.* 2000a]. Unter diesen Umständen zeigen alle ND10-lokalisierenden Proteine ein anderes Verteilungsmuster und lokalisieren an alternativen Stellen im Kern [Dyck *et al.* 1994; Koken *et al.* 1994; Weis *et al.* 1994; Maul *et al.* 1995; Zhong *et al.* 2000a]. PML-knock-out-Mäuse entwickeln sich normal, sind jedoch anfälliger für Tumorerkrankungen und Virusinfektionen.

Obwohl keine direkte Interaktion mit PML besteht [Koken *et al.* 1994], nimmt man an, dass das Sp100-Protein eine weitere strukturgebende Komponente der ND10 ist [Sternsdorf *et al.* 1997b]. Ähnlich dem PML-Protein ist Sp100 ein Phosphoprotein, das in mehreren Spleißformen vorliegt und durch SUMO-1 modifiziert werden kann [Sternsdorf *et al.* 1997b; Guldner *et al.* 1999; Sternsdorf *et al.* 1999]. Mutiertes Sp100,

das keine SUMO-1-Modifikationsstelle mehr aufweist, zeigt auch ND10-Lokalisation. Da diese Experimente jedoch in Anwesenheit von endogenem Sp100 durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Beobachtung auf die Fähigkeit von Sp100 zur Homo-Oligomerisierung zurückzuführen ist [Sternsdorf *et al.* 1999; Negorev *et al.* 2001]. Es wird angenommen, dass die SUMO-1-Modifikation von Sp100 für die ND10-Lokalisation des Proteins nicht notwendig ist, die ND10-Lokalisation dadurch aber erheblich verstärkt wird [Seeler *et al.* 2001]. Die SUMO-1-Modifikation von Sp100 scheint außerdem die Interaktion mit den Partnerproteinen zu stabilisieren [Seeler *et al.* 2001]. Sp100 liegt in mindestens vier unterschiedlichen Spleißvarianten vor, deren Transkription durch Interferon hochreguliert wird [Guldner *et al.* 1992; Guldner *et al.* 1999]. Die unterschiedlichen Proteinvarianten zeigen z. T. verschiedene Lokalisationen im Kern [Seeler *et al.* 2001]. Vergleichende Sequenzanalysen lassen annehmen, dass die Sp100-Proteine eine Rolle in der Transkriptionsregulation spielen [Szostecki *et al.* 1990; Szostecki 1991; Xie *et al.* 1993; Seeler *et al.* 2001]. Sp100 bindet vermutlich nicht direkt an DNA, sondern wird durch Assoziation mit DNA-bindenden Proteinen wie hHMG2/DSP1, dem Heterochromatin-Protein HP1 [Seeler *et al.* 1998], ETS-1 [Wasylyk *et al.* 2002] oder dem B-Zell-spezifischen Transaktivator Bright zur DNA rekrutiert. Während die Interaktion von Sp100 mit hHMG2/DSP1, HP1 oder Bright zur Inhibition der Transkription führt, vermittelt die Bindung an ETS-1 die Expressionsstimulation der ETS-1-Zielgene. Je nach Bindungspartner wird somit die Expression bestimmter Gene angeregt oder herunterreguliert [Lehming *et al.* 1998; Möller *et al.* 2003]. Neuerdings wird zusätzlich über eine Adapterfunktion von Sp100 zwischen Kernproteinen und ND10 diskutiert [Naka *et al.* 2002].

Ein direkt mit PML interagierendes Protein, das Lokalisation in ND10 zeigt, ist Daxx [Ishov *et al.* 1999]. Ursprünglich wurde Daxx als ein Protein identifiziert, das mit der „Todesdomäne“ des Fas-Rezeptors assoziiert ist [Kiriakidou *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997]. Es wurde vermutet, dass es den Fas-induzierten Zelltod vermitteln kann. Die Erkenntnis, dass Mausembryonen, denen ein funktionelles Daxx-Gen fehlt, frühzeitig sterben, ließen jedoch Zweifel an dieser Hypothese aufkommen [Michaelson *et al.* 1999]. Immer noch wird die Rolle von Daxx in der Apoptose kontrovers diskutiert [Charette *et al.* 2000; Zhong *et al.* 2000b; Gongora *et al.* 2001; Perlman *et al.* 2001]. Inzwischen sind sehr viele Proteine bekannt, die mit Daxx interagieren sollen. So bindet Daxx über seinen C-Terminus (AS 625 bis 740) nicht nur PML [Ishov *et al.* 1999], sondern ebenfalls CENC-C [Pluta *et al.* 1998], FasD [Yang *et al.* 1997] und Pax3

[Hollenbach *et al.* 1999]. Neben der Daxx-Lokalisation in ND10 durch die Interaktion mit SUMO-modifiziertem PML [Ishov *et al.* 1999] findet man Daxx in Assoziation mit Histon-Deacetylasen (HDAC) im Heterochromatin [Li *et al.* 2000a]. Die Interaktion von Daxx mit dem Transkriptions-Faktor Pax3 führt zur Repression der transkriptionellen Aktivität von Pax3 [Hollenbach *et al.* 1999]. Ebenso konnte beobachtet werden, dass durch die Interaktion zwischen ETS-1 und Daxx die ETS-1-vermittelte Transkription reprimiert wird [Li *et al.* 2000b]. Die Verfügbarkeit von Daxx und somit seine Wirkung als transkriptioneller Inhibitor wird durch seine Rekrutierung in bzw. seine Entlassung aus ND10 reguliert [Li *et al.* 2000a; Lehembre *et al.* 2001]. Ebenso soll der Phosphorylierungsstatus von Daxx bei der Interaktion mit anderen Proteinen und der damit verbundenen Lokalisation des Proteins eine entscheidende Rolle spielen [Ecsedy *et al.* 2003]. In unterschiedlichen Versuchssystemen und Organismen treten immer wieder Widersprüche zwischen den einzelnen Ergebnissen auf. So konnte in B-Zellen gezeigt werden, dass Daxx durch Interaktion mit Pax5 sowohl koaktivierende als auch koinhibitorische Aktivität aufweist [Emelyanov *et al.* 2002]. Neben seinem Einfluss auf die Transkription wird Daxx als Adapterprotein diskutiert [Maul *et al.* 2000]. Es soll die ND10-Lokalisation diverser zellulärer Proteine vermitteln, die selbst keine Interaktion mit PML aufweisen. Außerdem wirkt Daxx als Adapter zwischen ND10 und dem viralen Tegumentprotein pp71 von humanen Cytomegaloviren [Hofmann *et al.* 2002; Ishov *et al.* 2002]. Diese Assoziation führt zur ND10-Lokalisation von pp71. Die Daxx/pp71-Interaktion ist die einzig bisher bekannte, die nicht über den C-Terminus von Daxx vermittelt wird.

Auch wenn die hier beschriebenen Proteine nur einen Bruchteil der mit ND10 assoziierten Kern-Komponenten darstellen, zeigen ihre zahlreichen Interaktionspartner die Komplexität der ND10 (Abb. 4). So wird diesen Kernstrukturen eine Rolle in der Transkriptionsregulation [LaMorte *et al.* 1998; Doucas 2000; Li and Chen 2000; Ruggero *et al.* 2000; Li *et al.* 2000a], in der Apoptose [Quignon *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998; Torii *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000b] und in der Differenzierung und Entwicklung von Zellen [Fogal *et al.* 2000; Ruggero *et al.* 2000; Gottifredi and Prives 2001] zugeschrieben. Da einige ND10-Komponenten die Gemeinsamkeit zeigen, unter IFN- γ Einfluss hochreguliert zu werden, werden ND10 zudem eine Rolle in der Virusabwehr zugeteilt [Guldner *et al.* 1992; Sternsdorf *et al.* 1997a]. Aufgrund der vielen mit ND10 assoziierten Proteine und des permanenten Wechsels an Proteinen durch unterschiedliche Stimuli [Nefkens *et al.* 2003] kann überdies nicht ausgeschlossen

werden, dass die hauptsächliche oder sogar einzige Aufgabe von ND10 in der Rekrutierung und Entlassung verschiedener Proteine besteht und somit ND10 die Verfügbarkeit der Proteine an anderen Stellen im Kern reguliert [Negorev and Maul 2001]. ND10 hätten folglich eine Aufgabe als Kerndepot für verschiedenste Zwecke und dienen der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase [Maul 1998; Dundr and Misteli 2001].

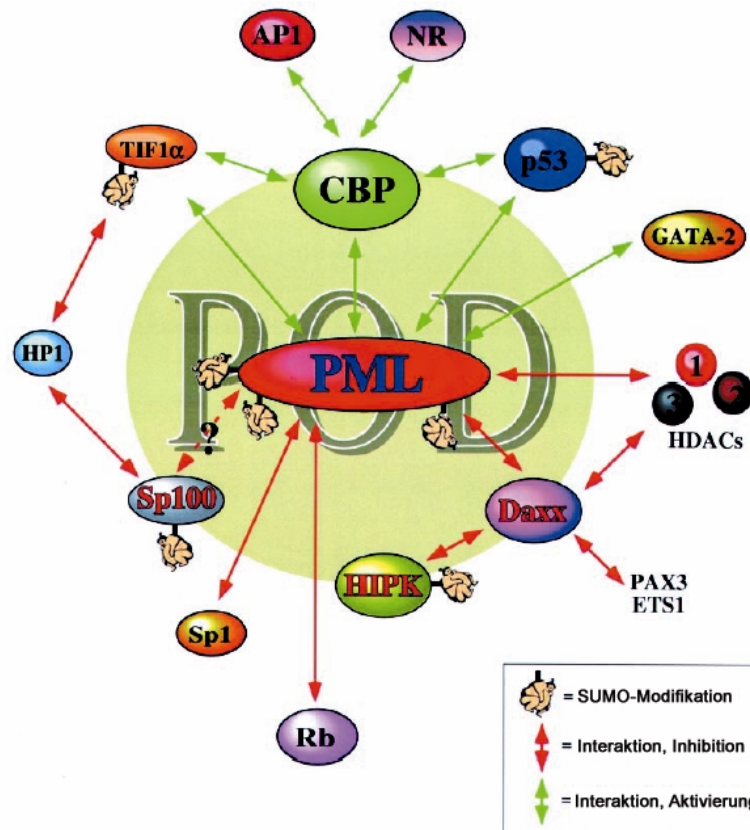


Abb. 4: ND10: mit PML assoziierte Proteine und transkriptionelle Regulation

Schematische Darstellung einiger mit ND10 assoziierter Proteine und ihrer Beteiligung an der Transkriptionsregulation in ND10; aus [Lin *et al.* 2001].

In einem weiteren Modell stellen ND10 Zentren dar, in denen transkriptionsaktive Komplexe zusammengebaut und evtl. posttranslational modifiziert werden [Lin *et al.* 2001]: durch SUMO-Modifikation [Fogal *et al.* 2000], Phosphorylierung [Kim *et al.* 1998; Moilanen *et al.* 1998] oder Acetylierung [Ferbeyre *et al.* 2000; Pearson *et al.* 2000].

1.2.2 ND10 als Orte viraler Replikation und Transkription

ND10 sind eng mit der Replikation und Transkription einiger Viren assoziiert [Maul 1998]. In frühen Infektionsstadien kommt es in der Regel zur völligen Umstrukturierung oder Zerstörung der ND10 durch virale Produkte. Die Assoziation von DNA-Viren mit ND10 wurde zum ersten Mal nach einer HSV-1-Infektion beschrieben [Maul *et al.* 1993]. Das regulatorische *immediate-early* Protein ICP0 lokalisiert in ND10 und induziert den Proteasomen-abhängigen Abbau von (SUMO-1-modifiziertem) PML und Sp100 [Everett *et al.* 1998; Chelbi-Alix and de The 1999; Parkinson and Everett 2000]. Ebenso konnte früh während der Infektion mit HCMV und Adenoviren die Zerstörung der ND10 durch die viralen Proteine IE1 bzw. E4orf3 beobachtet werden [Carvalho *et al.* 1995; Kelly *et al.* 1995; Doucas *et al.* 1996; Ishov and Maul 1996; Koriath *et al.* 1996; Ahn and Hayward 1997; Ahn *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 1998]. Bei Epstein-Barr Viren (EBV) liegt während der Latenzphase keine Assoziation des viralen Genoms mit ND10 vor [Bell *et al.* 2000; Wu *et al.* 2000]. Dies ändert sich aber während der lytischen Replikation und es kommt zeitgleich zur Zerstörung der ND10 [Bell *et al.* 2000]. Im Gegensatz zu diesen „großen DNA-Viren“ ist zwar die Replikation und Transkription von SV40 und Papillomviren mit ND10 assoziiert [Ishov and Maul 1996; Swindle *et al.* 1999; Tang *et al.* 2000], diese „kleinen Viren“ induzieren aber nicht die Zerstörung von ND10.

Zu welchem Zweck die im Zellkern replizierenden Viren eine ND10-Lokalisation aufweisen, ist nicht klar. Die räumliche Nähe der viralen Transkriptions- und Replikationsprozesse zu den Kerndomänen lässt zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen können durch die Zerstörung von ND10 zelluläre Faktoren freigesetzt werden, die den viralen Infektionszyklus unterstützen. Zum anderen kann aber auch genau das Gegenteil der Fall sein und ND10-assoziierte Faktoren können reprimierende Effekte auf das virale Genom ausüben [Everett 2001].

1.3 Viren und ihre Assoziation zu Chaperonen

Chaperone sind in eukaryotischen Zellen an einer Vielzahl von Prozessen wie der Faltung wachsender Proteinketten [Hartl and Hayer-Hartl 2002], intrazellulärem Vesikeltransport und Signal-Transduktion [Mayer and Bukau 1998] beteiligt. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Chaperon-Typen. Hsc70 und sein stress-induziertes Homolog Hsp70 sind direkt an der Substratreaktion beteiligt. Sie werden durch verschiedene Kochaperone wie Hsp40, Hip und Bag-1 unterstützt und moduliert.

Es konnte beobachtet werden, dass die Expression zellulärer Chaperone durch viele Virusinfektionen induziert wird. Hierbei ist oft schwer festzustellen, ob die Chaperone für die viralen Prozesse innerhalb der Zelle benötigt werden oder ob sie indirekt durch die Stresssituation der Zelle induziert werden. Chaperone spielen in den Lebenszyklen von sehr unterschiedlichen Viren eine wesentliche Rolle. Sie sind an viraler Replikation, Transkriptionsregulation, Kerntransport und dem Zusammenbau der Virionen beteiligt [Jindal and Young 1992; Macejak and Sarnow 1992]. So bindet Hsc70 an die Kapsidproteine von Polyomaviren [Cripe *et al.* 1995] und unterstützt die transformierende Funktion des SV40 T-Antigens [Sullivan *et al.* 2000]. Für das Affen-Adenovirus CELO konnte gezeigt werden, dass Hsc70 den Kerntransport der viralen DNA unterstützt, an die Kapsidproteine bindet und für die Replikation essenziell ist [Niewiarowska *et al.* 1992; Glotzer *et al.* 2000; Saphire *et al.* 2000]. Bei Papillomviren ist Hsc70 in die virale Replikation involviert, indem es die Bindung des E1-Proteins an den Replikationsursprung fördert [Liu *et al.* 1998]. Bei einigen Viren unterstützt Hsc70 nicht nur den Zusammenbau der Virionen, sondern wird sogar in die Kapside eingebaut [Sagara and Kawai 1992; Gurer *et al.* 2002].

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Einblicke in die Morphogenese von Papillomviren, speziell von HPV33, erlangt werden. Hierbei wurde das Augenmerk auf das Kapsidprotein L2 gerichtet, das man jahrelang bei entsprechenden Untersuchungen vernachlässigt hat. Dieses Protein akkumuliert in bestimmten Kernpunkten [Day *et al.* 1998], den ND10, und induziert die Reorganisation dieser Kernstrukturen. Sp100, das normalerweise in ND10 lokalisiert ist, wird L2-abhängig aus ND10 ausgeschlossen, und Daxx, ein weiteres Protein in ND10, wird durch L2 verstärkt dorthin rekrutiert [Florin *et al.* 2002b]. Im Anschluss daran kommt es zur Akkumulation des Kapsidproteins L1, das ohne L2-Expression diffuse nukleoplasmatische Verteilung zeigt [Florin *et al.* 2002a]. Mit Hilfe von Mutationsanalysen und L2/GFP-Fusionsproteinen sollte die Domäne in L2 kartiert werden, die für die ND10-Lokalisation verantwortlich ist. Ebenso sollte ermittelt werden, ob die Eigenschaft der ND10-Lokalisation mit denen der ND10-Reorganisation und L1-Rekrutierung im L2-Protein übereinstimmt oder ob die Funktionen in verschiedenen Domänen von L2 zu finden sind.

Die Untersuchungen zielten auch darauf ab, die Interaktion zwischen den Kapsidproteinen, die in der L2-induzierten L1-Rekrutierung und dem Einbau von L2 in die HPV-Kapside resultiert, genauer zu analysieren. Sowohl die verantwortlichen L2-Domänen als auch zelluläre Voraussetzungen wurden untersucht.

Da neben L2 auch andere HPV-Proteine (L2-abhängig oder L2-unabhängig) ND10-Lokalisation zeigen und die virale Replikation in oder in unmittelbarer Nähe von ND10 stattfindet [Day *et al.* 1998; Swindle *et al.* 1999; Florin *et al.* 2002a], werden ND10 als Orte der Papillomvirus-Morphogenese angenommen. Es stellte sich die Frage, ob die ND10 essenziell für die Morphogenese von HPV33 sind. Für diese Untersuchungen sollten Zelllinien verwendet werden, die nicht mehr über das PML-Protein, die Hauptstrukturkomponente der ND10, verfügten. Am Beispiel des L2-Einbaus in virusähnliche Partikel (VLPs) bzw. der Herstellung von Pseudovirionen in diesen Zellen sollte die Rolle der ND10 untersucht werden.

Eine weitere zelluläre Komponente, die an der HPV-Morphogenese beteiligt zu sein scheint, ist Daxx. Es konnte eine gemeinsame Akkumulation von L2 und Daxx in ND10 beobachtet werden. Daxx stellt in einigen Fällen das Adaptermolekül zwischen einem Protein und ND10 dar, und es ist bekannt, dass das Tegumentprotein pp71 von HCMV

über Daxx in ND10 rekrutiert wird [Hofmann *et al.* 2002; Ishov *et al.* 2002]. Die Rolle von Daxx bei der ND10-Lokalisation von L2 sollte mit Hilfe von Zelllinien verifiziert werden, die nur über Teilkonstrukte von Daxx verfügten oder negativ für dieses Protein waren.

Es war gelungen, den unabhängigen Transport der Kapsidproteine L1 und L2 in den Kern zu zeigen [Florin *et al.* 2002a]. Zu dieser Erkenntnis trug u. a. das unterschiedliche Verhalten der beiden Proteine unter Einfluss des Proteasomen-Inhibitors MG132 bei. L2 wird im Cytoplasma der Zellen zurückgehalten, wenn während der Expression MG132 zugefügt wird. Wodurch dieses Phänomen verursacht wird bzw. welche zellulären Faktoren daran beteiligt sind, sollte mit dem Einsatz von unterschiedlichen biochemischen Substanzen und immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Labormaterialien

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler AE 100	Mettler
Autoklav	Modell 23	Melag
Brutschrank	Heraeus 6000	Heraeus
Elektronenmikroskop	EM 900	ZEISS
Elektrophorese-Apparaturen		LMS GmbH Labortechnik (Dossenheim)
Elektroporations-Apparaturen	Cell Porator	Gibco BRL
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	ZEISS
Software	Axio Vision 3.1	Carl Zeiss Vision GmbH
Heizblöcke	Blockthermostat BT 1303	HLC
Laborwaage	BL 1500S	Sartorius
konfokales Mikroskop	Zeiss 501 laserscan microscope	ZEISS
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke & Kunkel
Mikroskop	Wilovert S	HUND Wetzlar
Mikrowellenofen	Micromat	AEG
Netzgeräte	PHERO-stab.500	Biotec-Fischer
	Power Pack P25	Biometra
pH-Meter	WTW pH Level 2	inoLab
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia
Pipetten	pipetman	GILSON
Pipettierhilfen	pipetus [®] -akku	Hirschmann Laborgeräte
Refraktometer	AR3-6D	Krüss Hamburg
Rotoren	Vti 65	Beckman
	Vti 55	Beckman
	SW 40	Beckman
	SW 60	Beckman
	GS 3	Du Pont Instruments
	HB 4	Du Pont Instruments
	GSA	Du Pont Instruments
	SS 34	Du Pont Instruments
Schüttelgerät	MS1 minishaker	IKA [®] Works
Schüttelinkubatoren	Ceromat R	Braun
Sofortbildkamera	BioDoc CCD Kamera	Biometra
sterile Werkbank	NU-440-400E (Class II)	NUAIRE
		Biological safety cabinets
Tischzentrifugen	Biofuge <i>pico</i>	Heraeus
	Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus
Transfer-Kammer	Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Ultrasentrifuge	L8-70M UZ	Beckman
UV-Transilluminator	Spectroline TC-312A	Biotec-Fischer
Wasserbäder	GRANT JB1	Grant Instruments (Cambridge)
	W12D	Peter Huber
		Kältemaschinenbau GmbH
Wasser-Deionisierungsanlage	Milli-Q	Millipore
Wipp-Schüttler	Rocky	
Zentrifugen	Labofuge 400R	Heraeus
	Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments

Alle Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Heidelberg) bezogen. Glaswaren stammten von der Firma Schott (Mainz).

Chemikalien und Reagenzien wurden über die Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham (Braunschweig), Bio-Rad (München), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia-LKB Biotechnology (Freiburg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Die verwendete Nitrocellulose(NC)-Membran stammte von der Firma Schleicher und Schüll (Dassel).

2.1.2 Fertigreagenzien

Produkt	Hersteller	Anwendung
JetSorb	Genomed	DNA-Extraktion aus Agarosegelen
TOPO-TA-Cloning	Invitrogen	Umklonierung
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel	Plasmid-Isolation (maxi)
<i>E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit</i>	Peqlab	Plasmid-Isolation (mini)
E.Z.N.A. Total RNA Kit	Peqlab	Gesamt-RNA-Isolation(mini)
<i>LipofectAmine™ Reagent + PLUS-Reagent</i>	Invitrogen	Transfektionsreagenz
Ready-To-Go™ PCR Beads	Amersham Biosciences	PCR
<i>Ready-To-Go™ RT-PCR Beads</i>	Amersham Biosciences	RT-PCR
<i>Dynabeads® M-280 Tosylactivated</i>	Dynal Biotech	Immunpräzipitation
<i>Quik Change® Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene	(Punkt-)Mutagenese
<i>ECL™ Western Blotting Detection Reagents</i>	Amersham Biosciences	WB-Detektion
<i>TMB Membrane Peroxidase Substrate</i>	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)	WB-Detektion
<i>Fluoprep</i>	bioMérieux	Einbettmedium
<i>Hoechst33342 (Bisbenzimid)</i>	SIGMA	DNA-Anfärbung

2.1.3 Enzyme und Medien

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England BioLabs bezogen und in den mitgelieferten, verdünnten Puffern nach Herstellerangabe eingesetzt.

<i>Deep Vent</i> [®] DNA Polymerase:	New England Biolabs
DNA-Ligase und RNase:	Roche
Klenow-Polymerase und Phosphatase:	New England Biolabs

Alle in der Zellkultur eingesetzten Medien und Reagenzien wurden über die Firmen Gibco BRL oder BioWhittaker bestellt.

2.1.4 Antikörper

primäre Antikörper	Epitop	aus Spezies	Bezugsquelle
33L2-1	HPV33 L2 (163-170)/16L2	monoklonal (Maus)	(Volpers <i>et al.</i> 1995)
33L2-2	HPV33 L2 (153-160)	monoklonal (Maus)	(M. Sapp)
33L1-7	HPV33 L1 (aa 303-313)	monoklonal (Maus)	(M. Sapp)
K53	HPV33 VLPs	polyklonal (Kaninchen)	(M. Sapp)
K28	HPV33 L2 (aa 117-130)	polyklonal (Kaninchen)	(M. Sapp)
K18	HPV16 L2 + 33L2	polyklonal (Kaninchen)	(M. Sapp)
K233	HPV33 L2	polyklonal (Kaninchen)	(M. Sapp)
α -PML	C-Terminus PML	polyklonal (Kaninchen)	Chemicon
α -PML	Maus-PML	monoklonal (Maus)	Upstate
α -Sp100		polyklonal (Kaninchen)	Chemicon
α -Sp100 „GH3“	C-Terminus	polyklonal (Kaninchen)	Hans Will
α -Daxx	mDaxx-aa627-739	polyklonal (Kaninchen)	Santa Cruz
α -Hsc70		monoklonal (Ratte)	Stressgen
α -Hsp40		polyklonal (Kaninchen)	Stressgen
α - α -Tubulin	C-Terminus von h- α -Tubulin	monoklonal (Maus)	Sigma
α -HA	YPYDVPDYA	monoklonal (Ratte)	ROCHE

sekundäre Antikörper	Konjugat	aus Spezies	Bezugsquelle
α -Kaninchen	Cy TM 3	Ziege	Dianova
	Alexa Fluor [®] 594	Esel	Molecular Probes
α -Ratte	POX	Ziege	Dianova
	Cy TM 3	Ziege	Dianova
	POX	Ziege	Dianova
	Alexa Fluor [®] 350	Ziege	Molecular Probes
α -Maus	Alexa Fluor [®] 594	Ziege	Molecular Probes
	DTAF	Ziege	Dianova
	Cy TM 2	Ziege	Dianova
	AlexaFluor [®] 594	Ziege	Molecular Probes
	Alexa Fluor [®] 488	Esel	Molecular Probes
	POX	Ziege	Dianova

2.1.5 Zell-Linien

COS-7: ATCC: CRL-1651

HuTK: ATCC: CRL-8303

PML^{-/-}: Maus-Fibroblasten, Gen-knock-out für PML
SV40 T-Antigen transformiert
von G. Maul [Wang *et al.* 1998]

PEF: Maus-Fibroblasten (Parentalzellen der PML^{-/-}-Zellen)
SV40 T-Antigen transformiert
von G. Maul [Wang *et al.* 1998]

Daxx^{-/-}: Maus-Fibroblasten, Gen-knock-out für Daxx
von G. Maul [Ishov *et al.* 2004]

E. coli DH5 α : ATCC: 53868

TOP10: Invitrogen chemisch kompetente *E. coli*-Zellen

ELEKTROMAX: Invitrogen elektro-kompetente *E. coli*-Zellen

XL1-Blue: Stratagene chemisch superkompetente *E. coli*-Zellen

2.1.6 Mutagenese-Primer

Alle Primer für diverse L2-Mutationen wurden bei der Firma Invitrogen bestellt. Lange Oligonukleotid-Primer (ab 33 nt) wurden PAGE-gereinigt. (Neu eingeführte Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt.)

Konstruktbezeichnung	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
16L2-HA in pUF	CGG AAT TGT ACC CGC GGC	CAA AAA GCT TTC AAG CGT AAT CTG GAA CAT CGT ATG GGT AGG CGG CCA GGC TCA CGT C	16L2 in pUF3
33L2-360/444 in pEGFP	ATT GAA TTC ATG GAT GGT TTG TAT GAT GTT TA	TAA GGA TCC CTA AGG ATG TAA AAC AAA GTC AGC	33L2 in pTM1
33L2-360/420 in pEGFP	ATT GAA TTC ATG GAT GGT TTG TAT GAT GTT TA	AAA GGA TCC CTA TGG GCT AGA TGT GGG AA	33L2 in pTM1
33L2-390/467 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GAG CAA TGT GTC TAT ACC T	GCG GGA TCC CTA GGC CGC CAC ACG GAC ATC	33L2 in pTM1
33L2-390/444 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GAG CAA TGT GTC TAT ACC T	TAA GGA TCC CTA AGG ATG TAA AAC AAA GTC AGC	33L2 in pTM1
33L2-390/420 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GAG CAA TGT GTC TAT ACC T	AAA GGA TCC CTA TGG GCT AGA TGT GGG AA	33L2 in pTM1
33L2-399/467 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GGG ATT TGA TAC TCC TGT T	GCG GGA TCC CTA GGC CGC CAC ACG GAC ATC	33L2 in pTM1
33L2-399/444 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GGG ATT TGA TAC TCC TGT T	TAA GGA TCC CTA AGG ATG TAA AAC AAA GTC AGC	33L2 in pTM1
33L2-399/420 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GGG ATT TGA TAC TCC TGT T	AAA GGA TCC CTA TGG GCT AGA TGT GGG AA	33L2 in pTM1
33L2-420/467 in pEGFP	TCT GAA TTC AAT GCC ATT TGT TCC TAT TTC G	GCG GGA TCC CTA GGC CGC CAC ACG GAC ATC	33L2 in pTM1
33L2-P408A in pTM	CCT GTT ATG TCT GGC GCT GAT ATA CCT TCC CCT TTA TTT CCC ACA TCT	AGA TGT GGG AAA TAA AGG GGA AGG TAT ATC AGC GCC AGA CAT AAC AGG	33L2 in pTM1
33L2-P408/413A in pTM	CCT GTT ATG TCT GGC GCT GAT ATA CCT TCC GCT TTA TTT CCC ACA TCT	AGA TGT GGG AAA TAA AGC GGA AGG TAT ATC AGC GCC AGA CAT AAC AGG	33L2 in pTM1
33L2-P413A in pTM	CCT GTT ATG TCT GGC CCT GAT ATA CCT TCC GCT TTA TTT CCC ACA TCT	AGA TGT GGG AAA TAA AGC GGA AGG TAT ATC AGG GCC AGA CAT AAC AGG	33L2 in pTM1
33L2-P420A in pTM	TTT CCC ACA TCT AGC GCA TTT GTT CCT ATT TCG	CGA AAT AGG AAC AAA TGC GCT AGA TGT GGG AAA	33L2 in pTM1
33L2-F427/428E in pTM	GTT CCT ATT TCG CCT GAG GAG CCT TTT GAC ACC ATT G	CAA TGG TGT CAA AAG GCT CCT CAG GCG AAA TAG GAA C	33L2 in pTM1

Konstruktbezeichnung	5'-Primer	3'-Primer	Matrize
diverse 33L2-406/410 Punktmutanten in pTM	GAT ACT CCT GTT ATG AGW SGC GCG GMT AWA CCT TCC CCT TTA TTT CC	GGA AAT AAA GGG GAA GGT WTA KCC GCG CSW CTC ATA ACA GGA GTA TC	33L2 in pTM1

2.1.7 Vektoren

pTM1:	[Moss <i>et al.</i> 1990]
pTM/33L2:	Das PCR-amplifizierte L2-Gen wurde in den mit EcoR I und BamH I linearisierten Vaccinia-Transfervektor kloniert [Unckell <i>et al.</i> 1997].
pEGFP-C1:	Invitrogen
pEGFP-C2:	Invitrogen
GFP/GFP-NLS:	In den pEGFP-C1-Vektor wurde ein weiteres GFP-Gen und zusätzlich die Kernlokalisationssequenz von HPV33 L1 kloniert (L. Florin).
pCMV-HA:	BD Biosciences
pCR [®] 2.1-TOPO [®] :	Invitrogen
pUF3/16L2:	Codon-optimiertes 16L2-Gen, über Not I und Hind III in den pUF3-Vektor kloniert [Leder <i>et al.</i> 2001].

2.1.8 Protein- und DNA-Marker

Protein-Marker:

LMW-Marker (low molecular weight calibration kit)		Pharmacia
Phosphorylase b	94 kD	
Albumin	67 kD	
Ovalbumin	43 kD	
Carboanhydrase	30 kD	
Trypsin-Inhibitor	20,1 kD	
α -Lactalbumin	14,4 kD	
HMW-Marker (high molecular weight calibration kit)		Pharmacia
Myosin	212 kD	
α 2-Makroglobulin	30 kD	
β -Galaktosidase	116 kD	
Transferrin	76 kD	
Glutamat-Dehydrogenase	53 kD	

DNA-Marker:

100bp DNA ladder	MBI Fermentas
MassRuler TM DNA ladder, High Range	MBI Fermentas

2.1.9 Lösungen

<u>DNA-Probenpuffer, 6x:</u>	0,25 % 0,25 % 15 %	Bromphenolblau Xylene cyanol Ficoll type 400
<u>Dounce-Puffer, pH 7,6:</u>	10 mM 10 mM 1,5 mM	HEPES KCl MgCl ₂
<u>HBS-Puffer, pH 7,05:</u>	2 mM 137 mM 5 mM 0,7 mM 6 mM	HEPES NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ Glucose
<u>HEBS-Puffer, 2x, pH 7,1:</u>	1,6 % 1 % 0,2 % 0,025 % 0,074 %	NaCl (w/v) HEPES (w/v) Glucose (w/v) Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O (w/v) KCl (w/v)
<u>Laemmli-Puffer, 5x:</u>	625 mM 10 % 10 % 5 mM 10 %	Tris, pH 6,8 SDS (w/v) Glycerin (v/v) EDTA ME (v/v)
<u>Laemmli-Laufpuffer, 5x:</u>	1,5 % 0,5 % 7,2 %	Tris SDS (w/v) Glycin (w/v)
<u>10x PBS, pH 7,4:</u>	1,37 M 27 mM 11,5 mM 65 mM	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
<u>TAE-Puffer, pH 8,0:</u>	40 mM 1 mM	Tris EDTA
<u>WB-Transferpuffer:</u>	25 mM 192 mM 20 %	Tris Glycin Methanol

2.2 Methoden

Alle hier nicht oder nur kurz aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen aus Sambrook *et al.* 1989 (*Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press) oder Ausubel *et al.* 1994 (*Current protocols in molecular biology*, Vol. 1-3. John Wiley & Sons) durchgeführt:

- Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und auf festen Kulturmedien
- Präparation von Plasmid-DNA: doppelter Cäsiumchlorid/Ethidiumbromid (CsCl/EtBR)-Gradient
- Reinigung und Konzentrierung von Plasmid-DNA aus wässrigen Lösungen
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Manipulation der Enden linearer DNA-Fragmente (Dephosphorylierung mit *calf intestinal phosphatase*)
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Ligation von DNA-Fragmenten
- gerichtete Mutagenese unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf NC-Membran – Western-Blot (WB)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

2.2.1 Arbeiten mit DNA

2.2.1.1 *In vitro* Mutagenese

Alle Deletionen und Substitutionen in 33L2- und 16L2-Genen wurden mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern und PCR (*polymerase chain reaction*) durchgeführt. Zusätzlich zu der *proof-reading* DNA-Polymerase *Deep Vent* kamen auch *Ready-To-GoTM PCR Beads* zum Einsatz.

Als Matrize diente das vollständige 33L2- bzw. 16L2-Gen in den Vektoren pTM1 bzw. pUF3, die zur Verfügung gestellt wurden [Unckell *et al.* 1997; Leder *et al.* 2001]. Alle Primer besaßen entweder eine EcoRI-, BamHI-, NotI- oder HindIII-Restriktionsschnittstelle zur weiteren Klonierung in die Vektoren pTM1, pUF3, pEGFP-C1 oder pEGFP-C2.

PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel gereinigt, die DNA-Banden eluiert und mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut oder zunächst in den PCR-Klonierungsvektor pCR[®] 2.1-TOPO[®] kloniert, herausgeschnitten und in den jeweiligen Expressionsvektor oder den Vaccinia-Transfervektor pTM1 umklont.

Für die Punktmutationen im 33L2-Gen wurde auf den *QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene zurückgegriffen und nach Herstellerangaben vorgegangen. Dieses Vorgehen ermöglichte die Punktmutation einer oder mehrerer Aminosäuren im L2-Gen in einer Reaktion direkt im gewünschten Vektor.

Zur Selektion positiver Transformanten wurden Ampicillin- oder Kanamycin-Agar-Platten verwendet. Der Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen wurde in den jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Zur Beseitigung kontaminierender RNA wurde außerdem Ribonuklease A aus Rinderpankreas in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt.

Die Elution der DNA-Fragmente aus Agarosegelen verlief unter Verwendung von Glasmilch (*Jetsorb*) nach Anleitung des Herstellers.

Für die Herstellung der rekombinanten Viren wurden größere Mengen der Transfervektoren benötigt. Dazu wurde die Plasmid-DNA einer 500 ml-Kultur des jeweiligen plasmidtragenden *E.coli*-Stammes durch CsCl/EtBr-Dichtegradientenzentrifugation oder mit Hilfe von *NucleoBond PC 500* gewonnen.

2.2.1.2 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden bei den Firmen GATC (Konstanz) oder GENterprise (Mainz) in Auftrag gegeben.

2.2.1.3 Transfektion von Säugetierzellen

16L2- oder 33L2-Genkonstrukte in den Expressionsvektoren pCMV-HA, pUF-A und pEGFP wurden über Elektroporation (große Ansätze) oder Lipofektion („6well“-Format) in die Zellen eingebracht.

Elektroporationsbedingungen:

COS-7	330 µF
	210 bis 220 Volt
PML ^{-/-} und PEF	800 µF
	180 bis 200 Volt

2.2.2 Arbeiten mit RNA

Zur Überprüfung der Gen-Ausschaltung in Daxx^{-/-}-Zellen und den davon abstammenden, stabil mit wtDaxx oder Daxx-Fragmenten rekonstituierten Zellen wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und diese in einer *reverse transcriptase* (RT)-PCR mit Daxx-Gen-spezifischen bzw. NeoI-spezifischen Primern eingesetzt.

2.2.2.1 RNA-Isolation aus Kulturzellen

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde auf ein Produkt der Firma PeqLab zurückgegriffen: *E.Z.N.A. Total RNA Kit*. Die RNA-Qualität und -Quantität wurde im Agarosegel untersucht und abgeschätzt.

2.2.2.2 RT-PCR

Die RNA-Proben aus den unterschiedlich oder nicht rekonstituierten Daxx^{-/-}-Zellen wurden in einer RT-PCR eingesetzt. Hierfür wurden zu den *Ready-To-Go RT-PCR Beads* der Firma Amersham Primer eingesetzt, die schon bei der Herstellung der Daxx^{-/-}-Zellen zur Kontrolle des Zell-Genotyps dienten [Ishov *et al.* 2004]:

GenDaxx227-Up: 5'-GCG GCT GCA GGA GAA GGA G-3', entsprechend den Basenpaaren 627 bis 645 von mDaxx cDNA

mDaxxGen4-Down: 5'-TTG TTA ATG AGC CGT TCA ATG-3', entsprechend den Basenpaaren 848 bis 827 von mDaxx cDNA

NeoI: 5'-TGC GAG GCC AGA GGC CAC TTG TGT AGC-3'

Die Kombination der Primer GenDaxx227-Up und mDaxxGen4-Down kann endogenes Daxx, transfiziertes wtDaxx und Δ C-Daxx nachweisen, wobei die Primer-Kombination GenDaxx227-Up und NeoI den Knock-out des endogenen Daxx-Gen (und stattdessen die Anwesenheit des Neomycin-Resistenzgens) bestätigen kann.

2.2.3 Kultivierung von Säugerzellen

Die Anzucht von allen oben aufgelisteten Zelllinien erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) unter Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco BRL) (→ DMEM⁺). Das Medium für die Kultur der retransfizierten Daxx^{-/-}-Zellen (pBABE) enthielt zusätzlich das Selektionsantibiotikum Puromycin (Sigma) in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml. Konfluente und adhärente Zellrasen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe von PBS/EDTA_{2,5%} oder Trypsin/EDTA

abgelöst. Die Verdünnung und weitere Kultivierung erfolgte abhängig vom jeweiligen Versuchsansatz.

2.2.4 Expression von Proteinen im Vacciniavirus-System

Rekombinante Vacciniaviren (vac) wurden für die transiente Genexpression der HPV-Kapsidproteine in Säugetierzellen eingesetzt. Bei den verwendeten Viren stand das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7-Promoters. Die Zellen mussten für eine Proteinexpression der HPV-Gene zusätzlich mit dem rekombinanten Vacciniavirus-Stamm pTM7-3 infiziert werden [Moss *et al.* 1990]. Dadurch gelangte das für die T7-RNA-Polymerase codierende Gen zusätzlich in die Zellen.

2.2.4.1 Infektion mit Vacciniaviren

Die Infektion von Zellen mit rekombinanten Vacciniaviren wurde in serumfreiem DMEM bei Raumtemperatur durchgeführt. Abhängig von dem jeweiligen Versuchsansatz wurde die Multiplizität der Infektion (MOI) zwischen 0,1 und 5 variiert. Nach einstündiger Inkubation wurde das Infektionsgemisch abgezogen und durch DMEM⁺ ersetzt. Nach Kultivierung bei 37 °C wurden die Zellen für die unterschiedlichen Versuchsansätze weiterbehandelt (s. u.). Wenn nicht anders angegeben, wurden HuTK⁻-Zellen verwendet.

2.2.4.2 Amplifikation von Vacciniaviren

Für die Amplifikation der rekombinanten Vacciniaviren wurden HuTK⁻-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach 36 bis 40 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in Medium abgeschabt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mM HEPES, pH 7,2 resuspendiert, zur Gewinnung der Viren zwei Gefrier/Tau-Zyklen unterworfen, mit 10x PBS gepuffert und bei -70 °C gelagert.

Die Bestimmung der Virustiter (PFU, *plaque forming units*) erfolgte durch Infektion von Zellen in „6well“-Platten mit verschiedenen Verdünnungen der Viren. Nach Kultivierung der infizierten Zellen für 48 Stunden wurden sie mit 0,3 % Kristallviolett in 4 % Ethanol überschichtet und die Plaques – in Kontrast zu dem gefärbten Zellrasen – ausgezählt.

2.2.4.3 Herstellung von rekombinanten Vacciniaviren

2.2.4.3.1 Präparation von Vaccinia-Wildtyp-DNA

Die Amplifikation der Wildtyp-Vacciniaviren erfolgte genau wie die der rekombinanten Viren; die virushaltigen Suspensionen wurden wie folgt aufgeschlossen: 2×10^7 infizierte Zellen in 1,5 ml PBS wurden mit 30 μ l Triton X-100, 1,5 μ l β -Mercaptoethanol (β -ME) und 48 μ l EDTA (250 mM, pH 8,0) versetzt. Einer zehnmütigen Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Invertieren des Reaktionsgefäßes folgte eine Zentrifugation für 2,5 Minuten bei 3.000 rpm (Tischzentrifuge). Der Zentrifugationsüberstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei 13.000 rpm für zehn Minuten unterworfen, wobei die Viren sedimentieren. Das Pellet wurde in 200 μ l TE-Puffer resuspendiert und 13,4 μ l 3 mM NaCl, 20 μ l 10% SDS, 0,6 μ l β -ME und 3 μ l Proteinase K (10 mg/ml) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde oder über Nacht bei 56 °C inkubiert, anschließend zwei Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktionen und einer Ethanol-fällung unterworfen. Die DNA-Gewinnung gelang mittels eines Glasstabes, auf den die DNA gewickelt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und dann getrocknet wurde. Die Resuspension wurde in H₂O vorgenommen.

2.2.4.3.2 Rekombination von Genen in das Vaccinia-Genom

Die *in vitro* Rekombination von Vacciniaviren wurde im „6well“-Format durchgeführt. 90%ig konfluente HuTK⁻-Zellen wurden gewaschen und zur Vorbereitung auf die Rekombination für eine Stunde mit einem temperatur-sensitiven Vacciniavirus-Stamm (ts7vv/MOI von 0,1) bei RT infiziert. Nach Austausch des Mediums gegen DMEM⁺ wurden die Zellen weitere zwei Stunden bei 33 °C kultiviert.

1 μ g des rekombinanten pTM-Transfervektors (enthält HPV-Gen der Wahl) und 1 μ g des Vaccinia-wt-Genoms wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, 125 μ l 2x HEBS-Puffer hinzugefügt und 125 μ l CaCl₂ (250 mM) zugetropft. Nach einer halbstündigen Inkubation bei RT wurde die DNA auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Das Calciumphosphat-Präzipitat verblieb unter ständigem Schwenken eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Zellen, bevor es gegen DMEM ersetzt wurde und die Zellen darin zwei weitere Stunden bei 39 °C kultiviert wurden. Nach zwei Tagen Inkubation der Zellen bei 39 °C in DMEM⁺ wurden die Zellen in Medium abgeschabt, abzentrifugiert und das Zellpellet in 900 μ l 10 mM HEPES/pH 7,2 aufgenommen. Zwei Gefrier/Tau-Zyklen setzten die Viren frei und das Gemisch wurde mit 10x PBS gepuffert, bevor es zur weiteren Amplifikation und Selektion erneut auf Zellen gegeben

wurde. Die weiteren Amplifikationen erfolgten in Anwesenheit von BrdU (5-Brom-2'-Desoxyuridin), welches auf rekombinante Vacciniaviren selektioniert, und so lange, bis Plaques zu beobachten waren.

2.2.4.3.3 Plaque-Reinigung rekombinanter Vacciniaviren

Zur Aufreinigung rekombinanter Vacciniaviren nach einer *in vitro* Rekombination wurde eine Plaque-Reinigung durchgeführt. HuTK⁻-Zellen in „6-well“-Platten wurden mit der dritten oder vierten Amplifikation infiziert und nach einstündiger Inkubation bei RT mit einem Gemisch aus DMEM⁺, BrdU (0,15 mg/ml) und Agarose (0,625 %) überschichtet. Die Zellen wurden so lange bei 37 °C kultiviert, bis Plaques makroskopisch sichtbar waren; sie wurden mit Spitzenaufsätzen von Eppendorf-Pipetten aus der Agarose gestochen und über Nacht in 1 ml DMEM bei 4 °C resuspendiert.

Diese virushaltigen Medien wurden wieder zur Infektion von HuTK⁻-Zellen verwendet, wobei so lange in Anwesenheit von BrdU amplifiziert wurde, bis Plaques klar zu erkennen waren. Die rekombinanten Vacciniaviren wurden durch Gefrier/Tau-Zyklen aus den Zellen gewonnen.

2.2.4.4 VLPs und Pseudovirionen

Virusähnliche Partikel (VLP) sind HPV-Kapside, die nur aus den Kapsidproteinen L1 und L2 (oder aber nur aus L1) bestehen und keine DNA verpackt haben. Pseudovirionen sind HPV-Kapside, die ein Markerplasmid, in diesem Fall GFP/GFP-NLS, enthalten.

2.2.4.4.1 Herstellung von HPV-Kapsiden

Zur Herstellung von Pseudovirionen wurde das Plasmid zunächst durch Elektroporation in COS-7-Zellen gebracht (dieser Schritt entfiel bei der VLP-Herstellung) und die Zellen zwei Tage nach Transfektion mit den für die Kapsidproteine L1 und L2 rekombinanten Vacciniaviren (zusätzlich VTF7-3) infiziert. In den Zellen wird das Markerplasmid amplifiziert und bei der Zusammenlagerung der Kapside verpackt.

2.2.4.4.2 Aufreinigung und Analyse

Für die Aufreinigung der DNA-haltigen Partikel und der VLPs wurde aus den infizierten Zellen ein Kernextrakt (s. 2.2.5.2) präpariert. Um die Viruspartikel aus den Kernen freizusetzen, erfolgte eine Ultraschallbehandlung (3 mal 45 Sekunden, 80er Intervalle,

40 % Leistung). Durch eine weitere Zentrifugation bei 10.000 rpm im SS34-Rotor (4 °C) wurde unlösliches Material abgetrennt. Der partikelhaltige Überstand wurde mit Cäsiumchlorid versetzt (0,4 g pro 1 ml Lösung) und es schloss sich eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (s. 2.2.5.4) an. Für Untersuchungen des L2-Einbaus in die L1-Kapside wurde zusätzlich eine analytische Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (s. 2.2.5.6) durchgeführt. Um die Pseudovirionen in Infektionsassays einsetzen zu können, erfolgte eine Dialyse gegen PBS (s. 2.2.5.3).

2.2.4.4.3 Infektionsansatz mit Pseudovirionen

Frisch dialysierte Pseudovirionen (5 bis 10 µl) wurden in 300 µl DMEM auf COS-7-Zellen gegeben und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM⁺ und eine Kultivierung der Zellen für 48 bis 72 Stunden, bis grüne Zellen gut sichtbar waren. Pseudovirionen-infizierte grüne und nicht-infizierte Zellen wurden ausgezählt.

2.2.5 Präparation von Proteinen

2.2.5.1 Herstellung eines Gesamtzellextraktes

Für eine Analyse von Proteinen, die in Zellkultur exprimiert wurden, wurden die Zellen in Medium abgeschabt, abzentrifugiert und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Die Proben wurden für die Analyse im SDS-Proteingel mit 5x Laemmli-Puffer versetzt und fünf Minuten bei 100 °C denaturiert.

2.2.5.2 Herstellung eines Kernextraktes

Geerntete Zellen wurden in Dounce-Puffer/NP40_{0,5%} (Zusatz von Aprotinin_{1µg/ml} und Leupeptin_{1µg/ml}) resuspendiert und nach einem Gefrier/Tau-Zyklus im Homogenisator aufgeschlossen. Durch Zentrifugation bei 3.000 rpm (HB4-Rotor) für fünf Minuten wurden die Kerne angereichert und wiederum in Dounce-Puffer/NP40_{0,5%} aufgenommen. Die Kernextrakte wurden mit Hilfe einer Ultraschall-Behandlung (3 mal 45 Sekunden, 80er Intervalle, 40 % Leistung) in Lösung gebracht und unlösliches Material in einer anschließenden Zentrifugation (10.000 rpm, zehn Minuten im SS34-Rotor) abgetrennt. Die Kernproteine befanden sich im Überstand.

2.2.5.3 Dialyse

CsCl-haltige Kapsidfraktionen wurden vor weiterführenden Untersuchungen dialysiert, um das zelltoxische Salz zu eliminieren. Die Dialyseschläuche wurden zuvor für zehn Minuten in $\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA}_{0,05\text{M}}$ gekocht (Lagerung bei 4 °C). Die Proben wurden dann in die Schläuche eingebracht und für mindestens eine Stunde gegen mehrere Liter PBS dialysiert.

2.2.5.4 Kontinuierliche CsCl-Gradienten-Zentrifugation

Die mit CsCl-versetzten Proben der VLPs oder Pseudovirionen wurden einer Ultra-Zentrifugation bei 55.000 rpm (Vti 65 Rotor; kleiner Gradient) oder 45.000 rpm (Vti 50-Rotor; großer Gradient) für mindestens zwölf Stunden unterworfen (12 °C). Der Gradient wurde zu 250 μl - (kleiner Gradient) bzw. 1,3 ml- (großer Gradient) Fraktionen ausgetropft. Die Fraktionen wurden im Western-Blot untersucht und der Brechungsindex (BI) im Refraktometer bestimmt. Proben konnten bei 4 °C gelagert werden.

2.2.5.5 CsCl-Stufengradienten-Zentrifugation

Um die VLPs bzw. Pseudovirionen im Elektronenmikroskop zu untersuchen, wurden die kapsidhaltigen Fraktionen des CsCl-Gradienten vereinigt und zur Abtrennung störender Zellkomponenten in einem CsCl-Stufengradienten aufgereinigt. Hierfür wurden die vereinigten Fraktionen zunächst für eine Stunde gegen PBS dialysiert und dann auf einen CsCl-Gradienten aufgebracht, der folgende Zusammensetzung hatte: 1 ml CsCl-Lösung mit einem BI von 1,3690, gefolgt von 600 μl einer CsCl-Lösung mit einem BI von 1,3618 und 5 ml einer CsCl-Lösung mit einem BI von 1,3489. Die Zentrifugation erfolgte bei 40.000 rpm für vier Stunden im SW40-Rotor (12 °C). Der Gradient wurde zu 350 μl -Fraktionen ausgetropft. Die Analyse der Fraktionen erfolgte im Western-Blot. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.5.6 Analytischer Saccharose-Gradient

Zur Analyse des L2-Einbaus in HPV-Kapside wurden die über CsCl-Gradienten aufgearbeiteten VLPs oder Pseudovirionen in einem kontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Hierzu wurde aus 60%iger und 10%iger Saccharose-Lösung unter Zusatz von Aprotinin_{1 $\mu\text{g}/\text{ml}$} , Leupeptin_{1 $\mu\text{g}/\text{ml}$} und BSA_{10 $\mu\text{g}/\text{ml}$} ein linearer Gradient gegossen und die vereinigten Proben aus dem CsCl-Gradienten (positiv für VLPs oder

Pseudovirionen) auf den Gradienten aufgebracht. Die Zentrifugation erfolgte bei 36.000 rpm für 2,5 Stunden im SW40-Rotor (4 °C). Die Fraktionen des Gradienten wurden von oben her in 750 µl-Portionen abgenommen und TCA-gefällt (s. 2.2.5.7), in Laemmli-Puffer aufgenommen und im Western-Blot untersucht.

2.2.5.7 Trichloressigsäure(TCA)-Fällung

Die Proteinproben wurden mit gleichem Volumen 20%iger TCA-Lösung versetzt ($[TCA]_{\text{end}} = 10\%$) und bei 13.000 rpm für zehn Minuten (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde nacheinander mit 5%iger TCA-Lösung und Aceton gewaschen und abschließend getrocknet. Das Pellet wurde in Laemmli-Puffer resuspendiert und fünf Minuten bei 100 °C gekocht.

2.2.5.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die in Laemmli-Puffer aufgenommenen Proben wurden einer denaturierenden Gelelektrophorese unterworfen: SDS-PAGE.

Das Sammelgel enthielt 5 %, das Trenngel für die Standarduntersuchungen 10 % Acrylamid, für die Untersuchungen der Immunpräzipitationen (L2/Daxx-Interaktion) 7 % des vernetzenden Agens.

2.2.5.9 Western-Blot

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden sie mittels Nass-Transfer auf einer NC-Membran immobilisiert und mit Antikörpern nachgewiesen. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden gelang mit Hilfe des ECL (verstärkte Chemilumineszenz).

2.2.5.10 Quantitative Auswertung der Western-Blots

Um das L1/L2-Verhältnis in Pseudovirionen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Western-Blots von Saccharose-Gradienten eingescannt und die Proteinbanden mit Hilfe der *Kodak 1D image analysis software* (Version 3.5) quantifiziert und die ermittelten Daten zueinander ins Verhältnis gesetzt.

2.2.5.11 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Proben aus dem CsCl-Stufengradienten wurden direkt für die Elektronenmikroskopie eingesetzt. 5 µl der kapsidhaltenden Proben wurden auf kohle-

beschichtete Kupfer-Grids aufgebracht und für die Negativ-Kontrastierung mit 2 % Phosphowolframsäure behandelt. Die Aufnahmen erfolgten an einem ZEISS EM900 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 80 kV und Vergrößerungen von 30.000 bis 140.000. Abzüge wurden auf Agfa-Fotopapier mit einer Vergrößerung von 1:2,5 gemacht. Die Arbeiten wurden unter Anleitung von W. Gebauer im Labor von J. Markl durchgeführt.

2.2.5.12 Immunhistochemie

Für Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen wurden Zellen auf Deckgläsern in „6well“-Platten ausgesät und nach Kultivierung über Nacht mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert oder rekombinanten Vacciniaviren infiziert. Nach Inkubation wurden die Zellen für mindestens 20 Minuten mit Methanol/EGTA_{0,02M} bei -20 °C fixiert, gewaschen, mit Ziegen-Normal-Serum abgesättigt und mit den jeweiligen primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Die Deckgläser wurden nach einer *Hoechst33342*-Behandlung (während einer der letzten Waschschriffe) mit *Fluoprep* eingebettet.

Für die Untersuchungen der L2-Expression unter dem Einfluss von MG132 und Nocodazol wurden diese Substanzen zu verschiedenen Zeitpunkten bis zum Inkubationsende dem Versuchansatz zugefügt. Der Proteasomen-Inhibitor MG132 (gelöst in DMSO) wurde in der Endkonzentration von 10 µM dem Medium zugesetzt, Nocodazol (gelöst in DMEM) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml.

Für die Analyse wurde ein Zeiss Axiovert 200 M-Mikroskop, eine Zeiss AxioCam-Digitalkamera und die *Axiovision Software 3.0* verwendet.

Die Arbeiten am Laser-Scan-Mikroskop wurden mit Hilfe von D. Strand im Labor von P. Galle vorgenommen. Für diese Untersuchungen wurden die Präparate für eine bessere Erhaltung der Strukturen mit Paraformaldehyd (2,5 % in PBS) für 20 Minuten fixiert und anschließend mit PBS/NP40 permeabilisiert. Die restlichen Schritte der Detektion entsprachen denen der Methanol-fixierten Deckgläser.

2.2.5.13 Immunpräzipitation

Um die Interaktion des L2-Proteins mit dem zellulären Daxx-Protein zu untersuchen, wurde ein Kernextrakt aus L2-exprimierenden Zellen hergestellt (s. 2.2.5.2). Dieser Kernextrakt wurde mit magnetischen Partikeln (*Dynabeads[®] M-280 Tosylactivated*) versetzt, die zuvor mit L2-spezifischen Antikörpern (Gemisch aus L2-1 und L2-2)

entsprechend der Herstellerangaben (DynaL Biotech) gekoppelt worden waren. Es wurde laut Protokoll vorgegangen. Durch Kochen der Proben konnten die Partikel von den zu untersuchenden Protein-Komplexen abgelöst werden. Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert.

3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das L2-Protein über zwei funktionelle Kernlokalisations-signale (NLS) verfügt und in den Kerndomänen ND10 lokalisiert. Die für die ND10-Lokalisation verantwortliche Sequenz wurde auf die Aminosäuren 390 bis 420 eingengt. L2 rekrutiert das Kapsidprotein L1 in ND10 und verursacht Veränderungen dieser Domänen: L2 induziert den proteolytischen Abbau einer weiteren Hauptstrukturkomponente der ND10, des Transkriptionsaktivators Sp100, der in den PODs nicht mehr nachgewiesen werden kann. Der Transkriptionsmodulator Daxx dagegen wird massiv zu ND10 rekrutiert [Florin *et al.* 2002a; Florin *et al.* 2002b].

Diese Daten sollten komplettiert und eine weitere Einengung der für die ND10-Lokalisation verantwortlichen L2-Proteinbereiche sollte vorgenommen werden. Um die L2-Sequenzen zu kartieren, die für die ND10-Lokalisation, die Rekrutierung von L1 und die Umstrukturierung der subnukleären Domänen verantwortlich sind, konnte auf eine Reihe von L2-Deletionsmutanten zurückgegriffen werden, die bereits in der Arbeitsgruppe vorlagen. Zusätzlich wurden im Verlauf dieser Arbeit verschiedene L2/GFP-Fusionskonstrukte hergestellt und weitere L2-Mutanten konstruiert, die durch homologe Rekombination in das Vacciniavirus-Genom eingebracht wurden.

Die L2-Mutanten sind schematisch in Abbildung 5A dargestellt, wobei die Kernlokalisations-signale (NLS) und die ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD) hervorgehoben wurden. Alle Mutanten wurden nach der ersten und letzten im Protein noch enthaltenen Aminosäure der Wildtyp-Sequenz bezeichnet. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde in einer SDS-PAGE und im Western-Blot überprüft (Abb. 5B). Alle Mutanten zeigten das erwartete Laufverhalten, wobei für das Wildtyp-Protein und die Mutante L2-12/390 ein höheres Expressionsniveau und zusätzliche Protein-Abbau-Banden beobachtet wurden. Die Ursachen hierfür sind unbekannt.

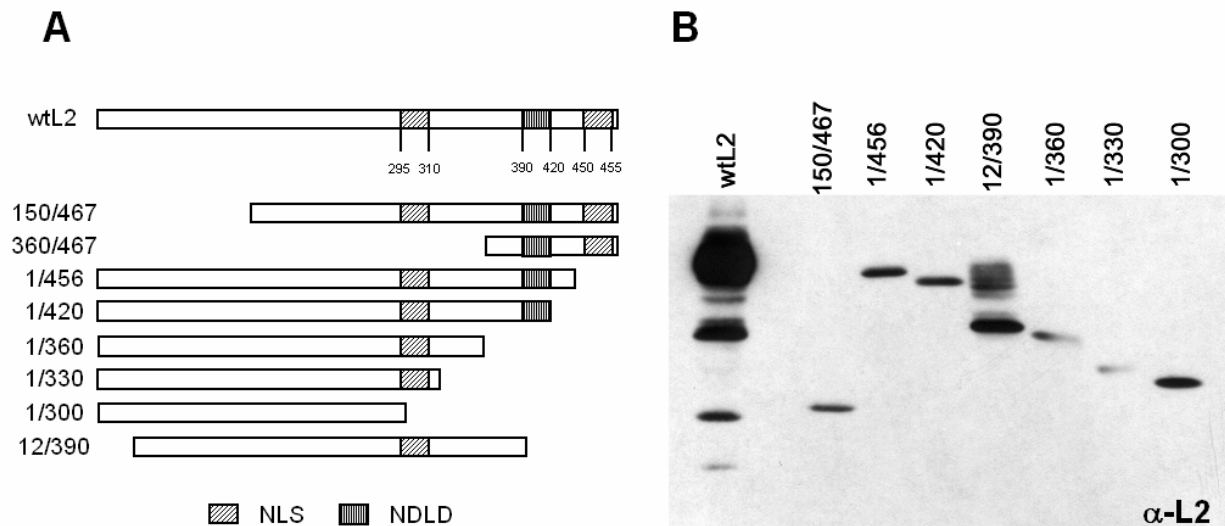


Abb. 5: Die verwendeten L2-Mutanten

(A) Schematische Darstellung der L2-Mutanten: Die jeweils erste und letzte im Konstrukt noch vorhandene Aminosäure der 33L2-Sequenz ist angegeben. NLS: Kernlokalisations-signal; NDLD: ND10-Lokalisationsdomäne.

(B) L2-Mutanten wurden exprimiert und die L2-Proteine mit dem mAK L2-1 im WB detektiert.

3.1 Die ND10-Assoziation von L2

3.1.1 Identifizierung der ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD)

Durch die Expression C- und N-terminaler L2-Mutanten mittels des Vacciniavirus-Systems in HuTK⁻-Zellen und die Detektion der Proteine in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit einem L2-spezifischen Antikörper konnte die für die ND10-Lokalisation verantwortliche Region in L2 nicht weiter eingengt werden (Abb. 6A). Mit Hilfe der Mutanten L2-12/390 und L2-1/420 konnte der essenzielle Teil der L2-Sequenz bestätigt werden, der die Lokalisation des L2-Proteins in den subzellulären Kernstrukturen bedingt [Florin 2002]. Im Gegensatz zu der Mutante L2-12/390 wurde das Deletionsprotein L2-1/420 in ND10 beobachtet. Der entscheidende Teil der NDLD liegt demnach im Bereich der Aminosäuren 390 bis 420. Der N-terminale Bereich des L2-Proteins, der im Protein L2-12/390 fehlt, trägt hingegen nicht zu einer ND10-Lokalisation bei, da auch L2-360/467 in den PODs detektiert werden konnte.

Zudem konnte durch Expression der Deletionsmutanten gezeigt werden, dass das Protein L2-1/300, das nicht über eine Kernlokalisationssequenz verfügt [Florin 2002], zwölf Stunden nach Infektion durch Diffusion in den Kern gelangte und dann eine diffuse Verteilung im Kern zeigte (Abb. 6A).

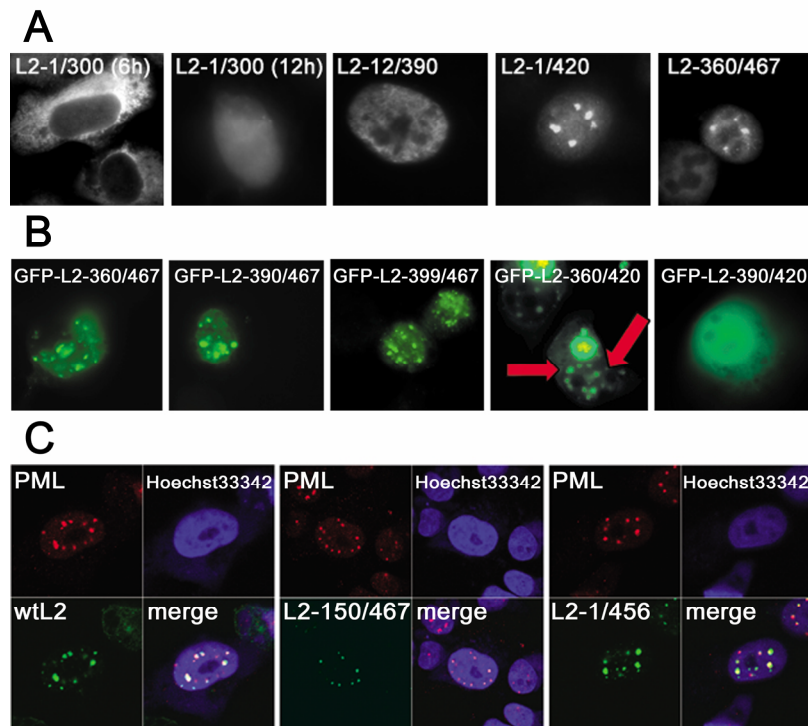


Abb. 6: NDLD-Charakterisierung des L2-Proteins

- (A) L2-Konstrukte wurden exprimiert und mit dem mAK L2-1 nachgewiesen. Im Fall der Mutante L2-360/467 erfolgte der Nachweis indirekt über die Rekrutierung des L1-Proteins in ND10.
- (B) COS-7-Zellen wurden mit L2/GFP-Fusionskonstrukten (pEGFP) transfiziert und die GFP-Fluoreszenz nach 48h im Mikroskop detektiert (die Pfeile deuten auf Fusionskonstrukte, die ND10-Lokalisation zeigten).
- (C) wtL2, L2-150/467 und L2-1/456 wurden exprimiert. L2 und PML wurden im konfokalen Mikroskop analysiert.

Eine weitere Eingrenzung der ND10-Lokalisationsdomäne im L2-Protein wurde mit Hilfe von L2/GFP-Fusionskonstrukten durchgeführt. Hierfür wurden kurze L2-Sequenzen mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen. Diese Konstrukte wurden über den Hilfsvektor pCR 2.1 in den zuvor geschnittenen Vektor pEGFP-C1 bzw. pEGFP-C2 kloniert. Nach Expression der L2-GFP-Konstrukte in COS-7-Zellen wurden die Zellen nach ca. 48 Stunden im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 6B). Auffällig war die extreme Neigung dieser GFP-Fusionen, in der Zelle Aggregate zu bilden, was die Auswertung der Versuche beeinträchtigte. Jedoch konnte festgehalten werden, dass die Konstrukte GFP-L2-399/467, GFP-L2-390/467, GFP-L2-360/467 und GFP-L2-360/420 in den ND10-Strukturen lokalisierten. Dagegen konnte das Protein GFP-L2-390/420 nicht in den subnukleären Strukturen nachgewiesen werden. Die Proteine L2-390/420, L2-399/467 und L2-360/420 enthielten keine Kernlokalisationssequenz. Die entsprechenden GFP-Fusionsproteine gelangten somit durch Diffusion in den Kern. Dies erklärt die zusätzliche diffuse Verteilung der Konstrukte im Cytoplasma. Zusammenfassend zeigten die Versuche, dass der Aminosäure-Bereich

399 bis 420 essenziell, aber nicht ausreichend ist, um das L2-Protein in den ND10 zu lokalisieren. Hierfür sind zusätzliche N- oder C-terminal flankierende Aminosäuren notwendig. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese die NDLD flankierenden Bereiche nur die Faltung der essenziellen NDLD-Bestandteile im Fusionsprotein unterstützen und nicht selbst zur ND10-Lokalisation von L2 beitragen.

Innerhalb dieser Expressionsstudien konnten immer wieder Unterschiede in dem Aussehen der L2-Aggregate in oder um ND10 festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den routinemäßigen Aufnahmen am ZEISS Fluoreszenzmikroskop Untersuchungen an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Die anfängliche Vermutung, dass C- und N-terminale L2-Mutanten trotz Aggregation im Kern dort unterschiedliche Strukturen in oder an PODs bilden, konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Aufnahmen an einem konfokalen Mikroskop ausgeschlossen werden (Abb. 6C). Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht immer eine 100%ige Überlagerung von L2 und der Hauptstrukturkomponente der ND10, dem PML-Protein, vorlag.

3.1.2 Charakterisierung der NDLD (Punktmutagenese)

3.1.2.1 Die Proline innerhalb der prolinreichen Sequenz tragen nicht zur NDLD bei

Die NDLD-Sequenz von L2 ist prolin- und serinreich (Abb. 7). Prolinreiche Sequenzen zeichnen typische Protein/Protein-Interaktionsdomänen aus, die mit vielfältigen Domänen, z. B. SH3 Domänen, in Wechselwirkung treten können [Kay *et al.* 2000]. Zudem weist diese L2-Region einige PxxP-Motive auf, die zwar nicht in allen krebsassoziierten HPV-Typen konserviert, aber in allen Typen an unterschiedlichen Stellen zu finden sind.

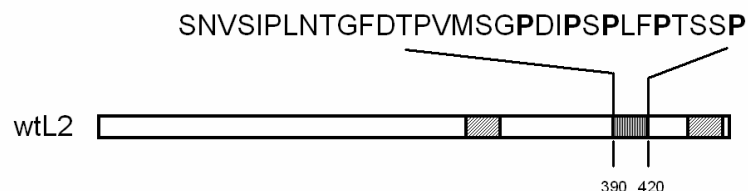


Abb. 7: Die NDLD in L2

Die für die ND10-Lokalisation verantwortliche L2-Domäne ist prolin- und serinreich. Die Proline in PxxP-Motiven wurden hervorgehoben.

Diese Abschnitte tendieren zur Ausbildung von PII-Helices [Adzhubei and Sternberg 1993]. Sie weisen drei Aminosäuren pro Windung auf. Die Proline liegen somit auf der gleichen Helix-Seite und vermitteln direkt die Wechselwirkung mit den Interaktionspartnern.

Um den Einfluss der vorhandenen PxxP-Motive auf die ND10-Lokalisation des L2-Proteins zu untersuchen, wurde ein Austausch der Aminosäure Prolin an den Stellen 408, 413 und 420 gegen Alanin mit Hilfe des *Quik Change*[®] *Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Die Verwendung dieses Produkts ermöglichte es, die L2-Mutagenese im pTM-Vektor durchzuführen. Durch homologe Rekombination zwischen Vektor- und Vacciniavirus-Sequenz wurden die Konstrukte in Vacciniaviren eingebracht. Nach Expression in HuTK⁻-Zellen zeigten die Mutanten L2-P408A, L2-P413A, L2-P408/413A und L2-P420A das gleiche Verhalten in Bezug auf die ND10-Lokalisation wie das Wildtyp-Protein (Abb. 8). Die Punktmutanten kolokalisierten in den ND10 mit dem PML-Protein genau wie wtL2, d. h. dass die Proline, bzw. die PxxP-Motive in dem Sequenzbereich 408 bis 420 keinen maßgeblichen Anteil an der NDLD des L2-Proteins haben.

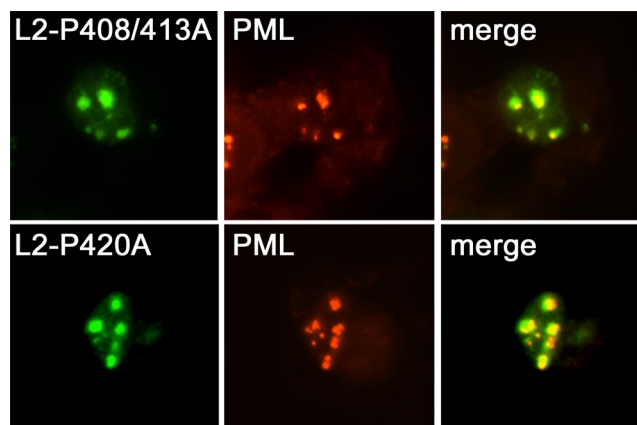


Abb. 8: Untersuchung der PxxP-Motive in der L2-NDLD

Die Prolin-Mutanten von L2 wurden in HuTK⁻-Zellen exprimiert. Zehn Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert und dem mAK L2-1 und dem pAK α -PML inkubiert.

3.1.2.2 Das hochkonservierte SGPDI-Motiv innerhalb der NDLD

Zusätzlich zu den in vielen HPV-Typen vorkommenden prolinreichen Sequenzen im L2-Protein fällt besonders eine Region (AS 406 bis 410, SGPDI) durch ihre extrem hohe Konservierung bei den genitalen HPV-Typen auf (Abb. 9).

HPV 33L2	399	G F D T P V M	S G P D I	P S P L F P T S S P	420
HPV 16L2	405	A Y N I P L V	S G P D I	P I N I T D Q A P S	426
HPV 18L2	394	S W D V P V Y	T G P D I	T L P S T T S V W P	415
HPV 11L2	389	P S D W F V Q	S G P D I	T F P T A S M G T P	410

Abb. 9: Sequenzvergleich der NDLD im L2-Protein genitaler HPV-Typen

Proline in dem gezeigten Sequenzabschnitt sind fett gezeichnet, die hochkonservierte Region zwischen den Aminosäuren 406 bis 410 (für 33L2) ist hervorgehoben.

Diese Region in HPV33 L2 umgibt das schon untersuchte Prolin 408 und zeichnet sich weder durch einen ausgesprochen hydrophoben noch durch einen polaren Charakter aus. Zur Untersuchung dieses Sequenzabschnittes wurden mehrere Punktmutationen miteinander kombiniert. Dabei wurden hydrophobe Aminosäuren zu polaren mutiert und umgekehrt. Die Mutationen in den Aminosäuren 406 bis 410 wurden wieder mit Hilfe des *Quik Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* in wtL2 eingeführt. Die Primer wurden so entworfen, dass an der Aminosäure-Position 408 ein Austausch von Prolin zu Alanin entstand und die Aminosäure-Positionen 406, 407, 409 und 410 zufällig entweder die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz erhielten: S406R, G407R, D409A und I410K. Dieses Vorgehen ermöglichte die Konstruktion von 16 unterschiedlichen Mutationskombinationen mit dem Einsatz von nur zwei „Oligonukleotid-Gemischen“.

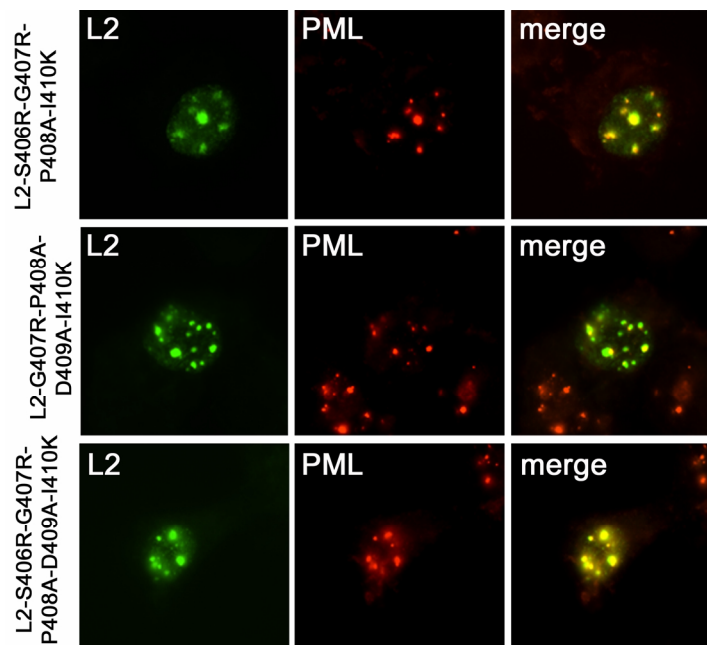


Abb. 10: Untersuchung des hochkonservierten SGPDI-Motivs in der NDLD

HuTK⁻-Zellen wurden mit VTF7-3 infiziert und eine Stunde später mit den angegebenen L2-Punktmutanten (AS-Bereich 406/410) in pTM transfiziert. Nach zwölf Stunden Expression wurden die Zellen fixiert und mit L2- und PML-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Um die Relevanz dieses Sequenzmotivs für die ND10-Lokalisation von L2 zu klären, wurden die mutierten L2-Konstrukte in HuTK⁻-Zellen exprimiert und die Zellen nach zehn Stunden für die Immunfluoreszenz fixiert. Der Nachweis erfolgte mit L2- und PML-spezifischen Antikörpern (Abb. 10). Der Einsatz aller möglichen Mutanten ergab, dass weder der Austausch einzelner noch kombinierter Aminosäuren in diesem Sequenzabschnitt die Fähigkeit des L2-Proteins veränderte, in ND10 zu lokalisieren. Weder die Kreation eines polaren Bereiches noch die eines hydrophoben Bereiches in dem Aminosäure-Abschnitt 406 bis 410 konnte den Interaktionsbereich des L2-Proteins mit einer POD-Komponente zerstören.

Somit steht die vollständige Identifizierung der Kernsequenz der NDLD von L2 noch aus.

3.1.3 L2-Lokalisation in PML-negativen Zellen

Wenn die Hauptstrukturkomponente der ND10, das PML-Protein, zerstört wird, so kommt es zum Zerfall der ND10 [Zhong *et al.* 2000a]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Lokalisation L2 in Zellen zeigt, die nicht mehr über ND10 verfügen. Für diese Untersuchung standen PML-knock-out-Zellen von G. Maul zur Verfügung. Bei diesen Zellen handelt es sich um Maus-Fibroblasten, die aus homozygot PML-defizienten Embryonen entnommen und durch Transfektion mit dem SV40 T-Antigen immortalisiert worden waren (PML^{-/-}). Als Kontrolle dienten die parentalen PEF-Zellen, in denen PML exprimiert wurde [Wang *et al.* 1998; Ishov *et al.* 1999].

Wurden PML^{-/-}-Zellen mit wtL2-rekombinanten Vacciniaviren infiziert, so lokalisierte L2 schon acht Stunden nach Infektion nahezu komplett in Kernaggregaten (Abb. 11A), die den ND10 in PML-haltigen Zellen – wie auch in den parentalen PEF-Zellen – sehr ähnlich waren. Ebenfalls konnte die Akkumulation von HPV16 L2 in solchen Kernpunkten beobachtet werden, wenn codon-optimiertes 16L2 nach Transfektion in den Zellen exprimiert wurde (Abb. 11B). Somit baut L2 PML-unabhängig selbst organisierte Strukturen im Kern auf, wobei der beobachtete Effekt weder von dem Expressionssystem abhängig noch auf 33L2 beschränkt ist.

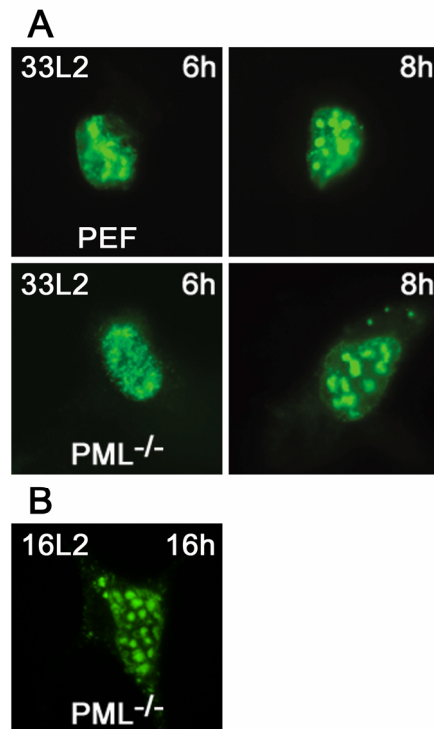


Abb. 11: L2-Expression in PML^{-/-}-Zellen

- (A) PML^{-/-}- und PEF-Zellen, die L2 exprimierten, wurden nach angegebener Zeit fixiert und mit dem mAK L2-1 inkubiert.
 (B) PML^{-/-}-Zellen wurden mit dem codon-optimierten 16L2-Konstrukt transfiziert, nach 16h fixiert und mit L2-1 behandelt.

3.2 Die L2-induzierte ND10-Reorganisation

Nachdem die NDLD auf eine 22 Aminosäuren kurze Sequenz in L2 eingeeengt werden konnte, ohne die entscheidend zur ND10-Lokalisation beitragenden Aminosäuren identifizieren zu können, wurde analysiert, welche Region im L2-Protein für die Reorganisation der ND10-Strukturen verantwortlich ist.

3.2.1 L2-induzierter Sp100-Ausschluss aus ND10

Für die Untersuchung des Verlustes des transkriptionellen Aktivators Sp100 wurden die gleichen L2-Mutanten eingesetzt wie für die zuvor beschriebenen Experimente.

In nicht behandelten HuTK⁻-Zellen zeigt Sp100 eine punktförmige Verteilung im Kern, die für die Lokalisation in ND10 charakteristisch ist (Abb. 12A). Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Expression von L2-Mutanten in HuTK⁻-Zellen (Abb. 12B) ergab, dass sowohl N-terminal (L2-150/467) als auch C-terminal deletierte L2-Proteine (L2-1/456 und 1/420) den Sp100-Verlust aus den ND10 induzierten. Es gab keine Mutante, die zwar in ND10 zu detektieren war, jedoch keine Relokalisation von Sp100 hervorrief. Ebenso wenig induzierte eine Mutante wie z. B. L2-1/360, die eine

diffuse Kernverteilung zeigt, den Verlust von Sp100 aus den Kernstrukturen. Auch die für die NDLD-Charakterisierung konstruierten L2-Punktmutanten, die alle in ND10 lokalisierten, zeigten keine Abweichung von dieser Regel (Abb. 12B).

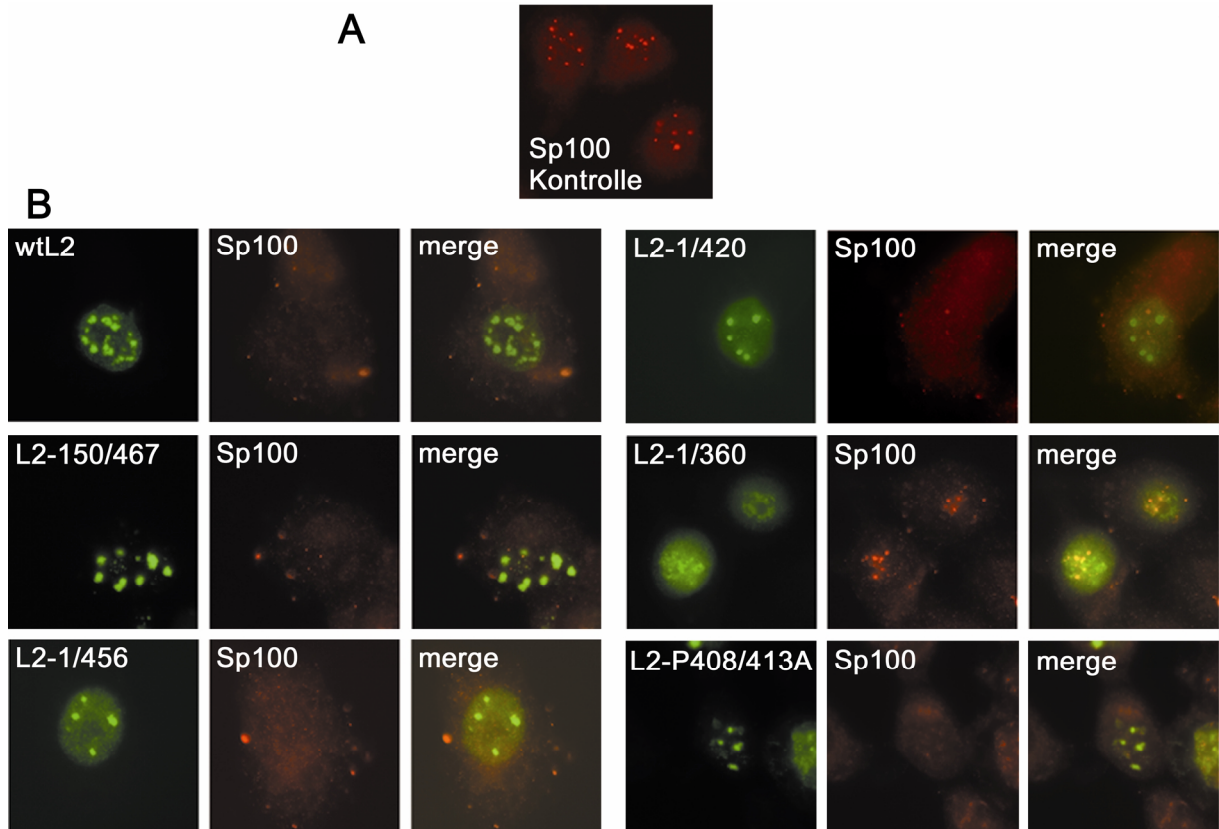


Abb. 12: Untersuchung des Sp100-Ausschlusses aus ND10 nach L2-Expression

- (A) Unbehandelte HuTK⁻-Zellen wurden mit Sp100-spezifischem Antikörper für die Immunfluoreszenz behandelt.
 (B) vacL2-Deletionsmutanten und die Punktmutante L2-P408/413A wurden in HuTK⁻-Zellen exprimiert, nach zwölf Stunden fixiert und mit L2- und Sp100-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Ergänzend zu den fluoreszenzmikroskopischen Daten wurde in einem Western-Blot kontrolliert, ob der durch bestimmte L2-Mutanten hervorgerufene Sp100-Ausschluss aus ND10 immer durch den proteolytischen Abbau des Proteins [Florin *et al.* 2002b] verursacht wurde (Abb. 13). Als Kontrollen dienten sowohl unbehandelte HuTK⁻-Zellen, solche, die mit VTF7-3 und vac33L1 infiziert wurden, als auch Zellen, die L2-Mutanten exprimierten, die nicht in ND10 lokalisierten. Der Western-Blot wurde zunächst mit einem Sp100-spezifischen Antikörper und nach dessen Entfernung mit einem L2-spezifischen Antikörper inkubiert. Die L2-Mutanten wurden etwa gleich exprimiert, wobei nur die Mutanten L2-1/360 und L2-1/330 ein geringeres Expressionsniveau zeigten. Die Expression der Mutante L2-360/467 konnte im Western-Blot nicht

nachgewiesen werden, da der zur Verfügung stehende Antikörper L2-1 die Aminosäuren 163 bis 170 des L2-Proteins erkennt.

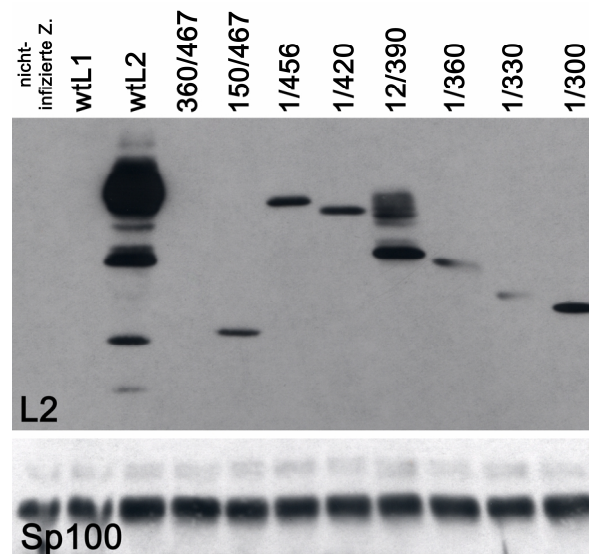


Abb. 13: Untersuchung des Sp100-Proteins nach L2-Expression

Proteinproben L1- oder L2-exprimierender Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse des WB erfolgte mit dem mAK L2-1 und dem pAK GH3 (α -Sp100). Als Kontrolle dienten neben den L1-exprimierenden Zellen zudem nicht-infizierte HuTK⁻-Zellen.

Entgegen früherer Beobachtungen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein proteolytischer Abbau des Sp100-Proteins nicht nachgewiesen werden. Die eingesetzten Proben der unterschiedlichen L2-Mutanten zeigten stets eine deutliche Sp100-Bande bei ca. 70 kD im Western-Blot, die für die gleiche Sp100-Konzentration in allen Zellen sprach. Ebenfalls konnte weder mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers (Chemicon) noch mit dem von H. Will zur Verfügung gestellten polyklonalen Serum gegen Sp100 („GH3“) im Fall von wt33L2 eine Abnahme von Sp100 beobachtet werden. Die verwendeten Antikörper sind beide gegen den C-Terminus von Sp100 gerichtet und erkennen alle der bisher bekannten Sp100-Spleißvarianten bzw. Isoformen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass genau diejenigen Sp100-Isoformen von dem proteolytischen Abbau betroffen sind, die im Western-Blot nicht detektiert werden konnten.

Der L2-induzierte Sp100-Ausschluss muss somit auf der Relokalisation von Sp100 aus ND10 und der diffusen Verteilung über das Nukleoplasma und/oder Cytoplasma beruhen. Eine erhöhte Sp100-Konzentration im Nukleoplasma oder Cytoplasma konnte jedoch aufgrund schwankender Hintergrund-Färbungen der immunhistochemisch behandelten Zellen nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die ND10-Lokalisationsdomäne des L2 für den induzierten Sp100-Verlust aus den ND10 notwendig ist und dass entgegen der bisherigen Annahme kein proteolytischer Abbau, sondern eine Relokalisation des Proteins für den Sp100-Verlust aus ND10 verantwortlich ist.

3.2.2 Interaktion von L2 mit dem Daxx-Protein

Ein weiterer, durch L2 induzierter Reorganisations-Vorgang der ND10 ist die Rekrutierung des transkriptionellen Modulators Daxx. Diesem Protein wurden inzwischen sowohl transkriptionsaktivierende [Emelyanov *et al.* 2002] als auch transkriptioneninhibitorische [Hollenbach *et al.* 1999; Li and Chen 2000; Li *et al.* 2000; Li *et al.* 2000a; Lehembre *et al.* 2001] Eigenschaften zugeschrieben. Daxx interagiert direkt mit PML [Ishov *et al.* 1999] und ist unter normalen Umständen sowohl in ND10 als auch im Heterochromatin zu finden. Eine Arbeitshypothese bezüglich der HPV-Morphogenese besagt, dass die Rekrutierung von Daxx in Kombination mit dem Verlust von Sp100 aus ND10 die virale Replikation und Transkription effektiv beendet [Florin *et al.* 2002b] und die virale DNA somit zum Minichromosom kondensieren kann, das dann in das Kapsid verpackt wird.

3.2.2.1 L2-induzierte Daxx-Rekrutierung in ND10

Nachdem der Nachweis schon vorlag, dass L2 mit Daxx interagiert [Florin *et al.* 2002b], wurde untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der ND10-Lokalisation der L2-Mutanten und der Daxx-Rekrutierung in diese Kernstrukturen besteht. Hierfür wurden wiederum die oben beschriebenen vac33L2-Mutanten eingesetzt. Zellen wurden 16 bis 24 Stunden nach Infektion fixiert und mit L2- und Daxx-spezifischen Antikörpern behandelt. Die Daxx-Rekrutierung wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Daten analysiert. In den nicht infizierten Zellen zeigte sich das typische Daxx-Muster im Kern: eine schwache, punktförmige Verteilung in Heterochromatin und ND10 (Abb. 14A). Genau wie wtL2 rekrutierte das N-terminal um 149 Aminosäuren verkürzte L2-Protein den Transkriptionsmodulator in die subnukleären Domänen (Abb. 14B). Und auch eine Mutante, die nur noch 108 C-terminale Aminosäuren aufwies, war in der Lage, die Daxx-Anreicherung in ND10 zu induzieren (Abb. 14C). In diesem Fall musste der mikroskopische Nachweis indirekt erbracht werden, da der im Labor vorhandene L2-Antikörper das stark verkürzte Protein nicht detektieren konnte. Die punktförmige Daxx-Aggregation im Kern jedoch ist als Nachweis eindeutig.

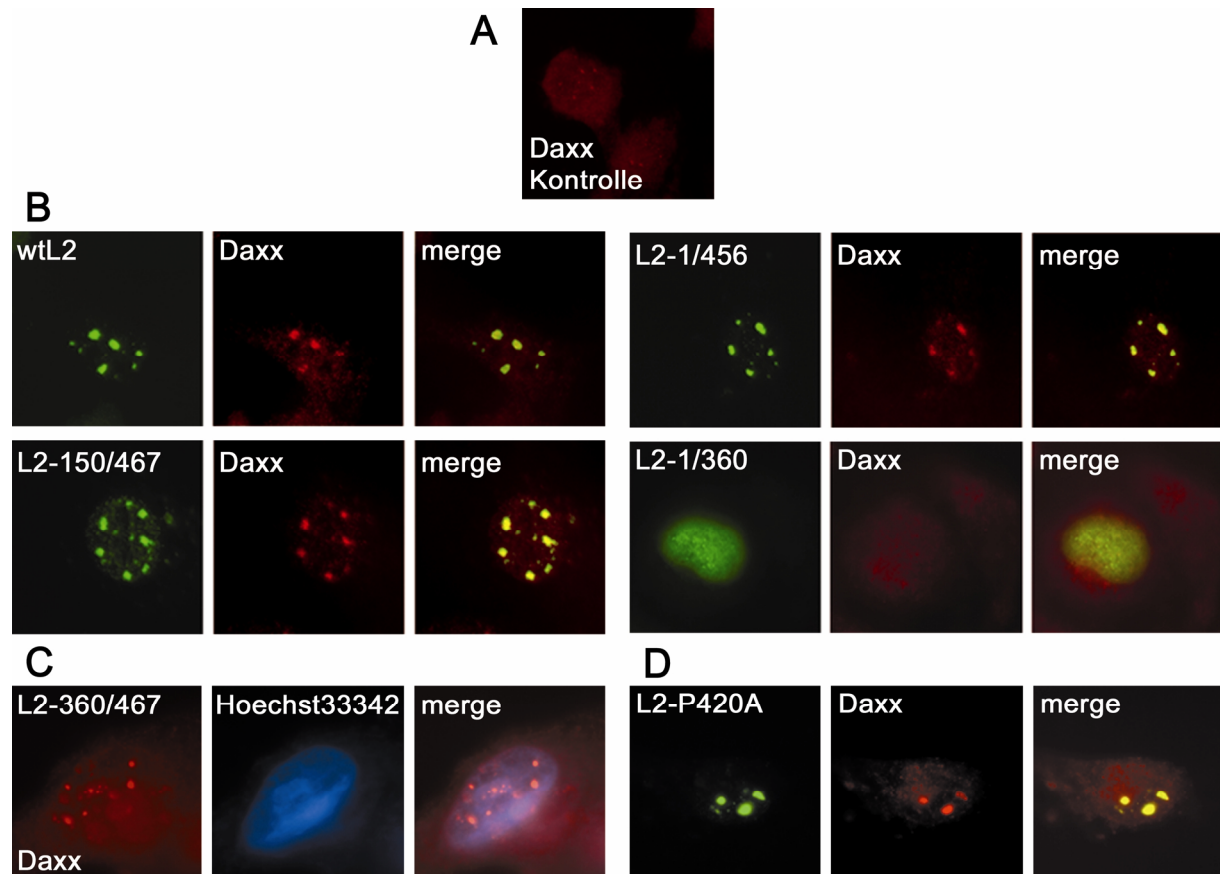


Abb. 14: Untersuchung des Daxx-Proteins nach L2-Expression

- (A) Unbehandelte HuTK⁻-Zellen wurden mit einem pAK gegen Daxx behandelt.
 (B) vacL2-Deletionsmutanten wurden exprimiert und zusammen mit Daxx visualisiert.
 (C) Zellen, die L2-360/467 exprimierten, wurden mit dem Daxx-Antikörper und *Hoechst33342* behandelt.
 (D) Nachweis von Daxx und L2 in L2-P420A-exprimierenden Zellen.

Ebenso wie die am N-Terminus verkürzten L2-Konstrukte konnten auch C-terminal deletierte L2-Proteine sowie die beschriebenen Prolin/Alanin-Punktmutanten Daxx rekrutieren (Abb.14B+D). Dahingegen war die Mutante L2-1/360, die keine Kolokalisation mit PML zeigte, nicht dazu in der Lage.

3.2.2.2 Koimmunpräzipitation von Daxx und L2

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass alle L2-Mutanten, die Daxx in ND10 rekrutieren, auch mit Daxx interagieren können. Für eine weitere Analyse der L2/Daxx-Interaktion wurde in Zusammenarbeit mit L. Florin eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden Kernextrakte von Zellen, die verschiedene L2-Mutanten exprimierten, mit magnetischen Partikeln inkubiert, die zuvor mit den L2-spezifischen Antikörpern L2-1 und L2-2 gekoppelt worden waren. Die Präzipitate wurden durch Kochen von den magnetischen Partikeln gelöst und einer Analyse in der SDS-PAGE

unterzogen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Kernlysate der Präparationen (Abb. 15).

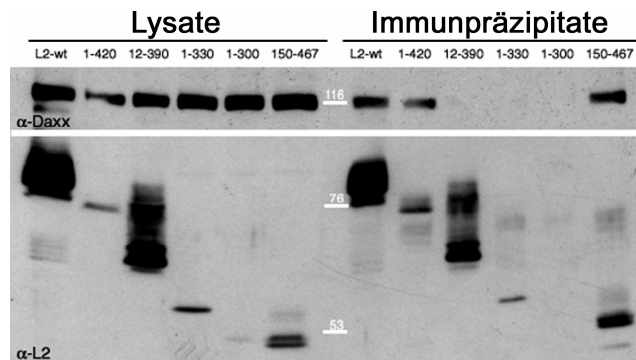


Abb. 15: Untersuchung der L2/Daxx-Interaktion durch Immunpräzipitation

vacL2-Mutanten wurden in HuTK-Zellen exprimiert. Aus diesen Zellen wurden Kernextrakte hergestellt, die einer Immunpräzipitation mit den mAK L2-1 und L2-2 unterworfen wurden. Proben der Kern-Lysate und der Immunpräzipitate wurden im WB mit einem Daxx-spezifischen Antikörper und dem mAK L2-1 analysiert.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation bestätigten die NDLD als Interaktionsdomäne von L2 mit Daxx: Durch die L2-Mutanten 12/390 und 1/360 konnte Daxx nicht kopräzipitiert werden, obwohl diese Mutanten im Kern lokalisieren. Dagegen konnten die Mutanten L2-1/420 und L2-150/467, die in ND10 lokalisieren, Daxx sowohl rekrutieren als auch koimmunpräzipitieren.

3.2.2.3 L2/Daxx-Interaktion in PML-negativen Zellen

Die Daxx-Rekrutierung durch alle L2-Mutanten, die in ND10 lokalisierten, ließ vermuten, dass die L2/Daxx-Interaktion von ND10 abhängig ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde L2 in PML^{-/-}-Zellen und den parentalen PEF-Zellen exprimiert und L2 und Daxx mit Antikörpern nachgewiesen.

Daxx zeigte in den PEF-Zellen die typische teils diffuse, teils punktförmige Verteilung im Kern, die charakteristisch für Heterochromatin und ND10 ist. In PML^{-/-}-Zellen war Daxx eher diffus verteilt und zeigte nur schwache Präsenz im Heterochromatin (Abb. 16A). Nach Expression von L2 akkumulierte Daxx in beiden Zelllinien in Kernaggregaten (Abb. 16B). Diese Kernpunkte expandierten im Laufe der Zeit und nach ca. 20 Stunden konnte der Großteil des zellulären Proteins in diesen Aggregaten nachgewiesen werden. Die Daxx-Anreicherungen überlappten in jedem Fall mit den L2-positiven Kernpunkten (Abb. 16B). Das Kapsidprotein L1 dagegen induzierte keine Aggregation des zellulären Proteins (Abb. 16C). Die Interaktion von Daxx und L2 und die damit verbundene Akkumulation von Daxx in den L2-Aggregaten ist somit PML-unabhängig.

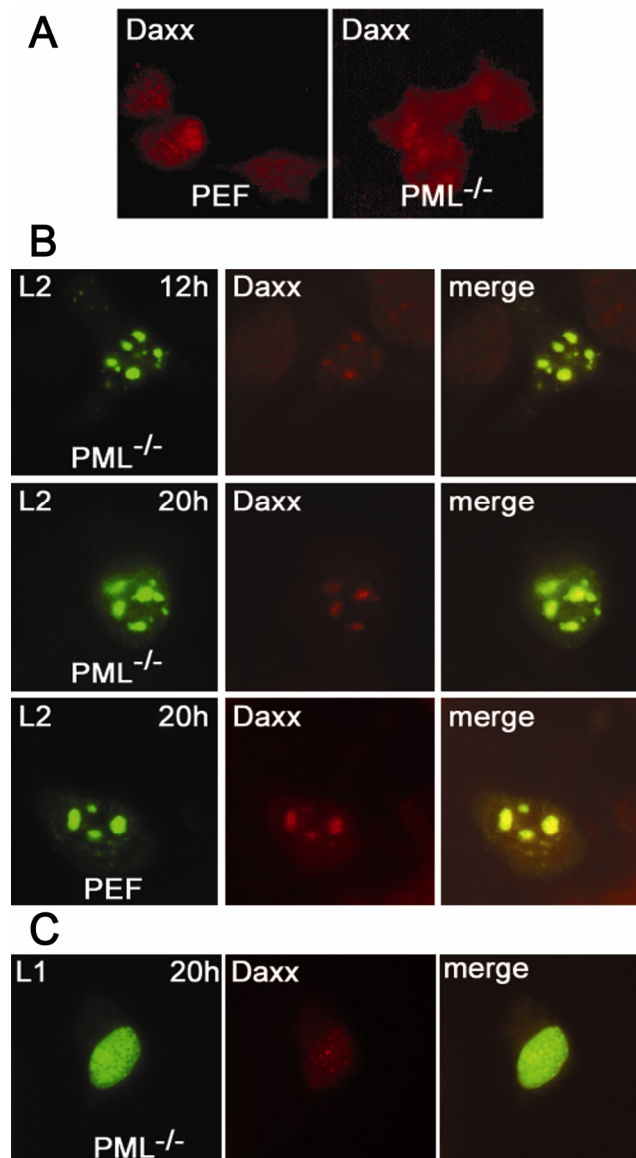


Abb. 16: L2-spezifische Daxx-Rekrutierung in Kernpunkte

(A) Daxx-Färbung in nicht-behandelten PML^{-/-} und PEF-Zellen

(B) PML^{-/-} und PEF-Zellen wurden mit vac33L2 infiziert und nach der Fixierung mit L2- und Daxx-spezifischen Antikörpern behandelt

(C) Daxx-Nachweis in 33L1-exprimierenden PML^{-/-}-Zellen.

3.2.2.4 Lokalisation von L2 in Daxx-negativen Zellen

Neben der Erkenntnis, dass die L2/Daxx-Interaktion PML-unabhängig ist, konnte in allen bisher untersuchten Zelllinien das gemeinsame Anwachsen der Proteinakkumulationen von L2 und Daxx beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass nicht L2 Daxx zu den PODs rekrutiert, sondern L2 durch Daxx als Adapter dorthin transportiert wird. Eine direkte Interaktion von Daxx wurde z. B. für das Tegumentprotein pp71 von HCMV nachgewiesen, die eine Voraussetzung für die ND10-Lokalisation des viralen Proteins ist. Es wird angenommen, dass Daxx als Adapterprotein zwischen PML und pp71 fungiert [Hofmann *et al.* 2002; Ishov *et al.*

2002]. Daxx interagiert außerdem mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, wobei in der Regel der C-Terminus des Proteins die Interaktionen vermittelt.

Ob Daxx wirklich das direkte oder indirekte Adapterprotein zwischen L2 und dem PML-Protein ist und somit die L2-Rekrutierung in die PODs bewirkt, sollte mit Hilfe von Daxx-knock-out-Zellen ($Daxx^{-/-}$) untersucht werden. Diese Zellen, sowie $Daxx^{-/-}$ -Zellen, die stabil mit wtDaxx, dem C-Terminus (C-Daxx; AS 629 bis 740) oder dem N-Terminus (Δ C-Daxx; AS 1 bis 625) von Daxx oder dem Kontrollplasmid pBabe transfiziert wurden, wurden von G. Maul zur Verfügung gestellt [Ishov *et al.* 2004].

Das Fehlen des Daxx-Gens, bzw. die Anwesenheit des transfizierten wt-Daxx und der Daxx-Teilkonstrukte wurde mittels einer RT-PCR verifiziert. Das Ergebnis bestätigte die Abwesenheit von endogenem Daxx bzw. die Anwesenheit der Daxx-Transkripte in den Zellen (Abb. 17A).

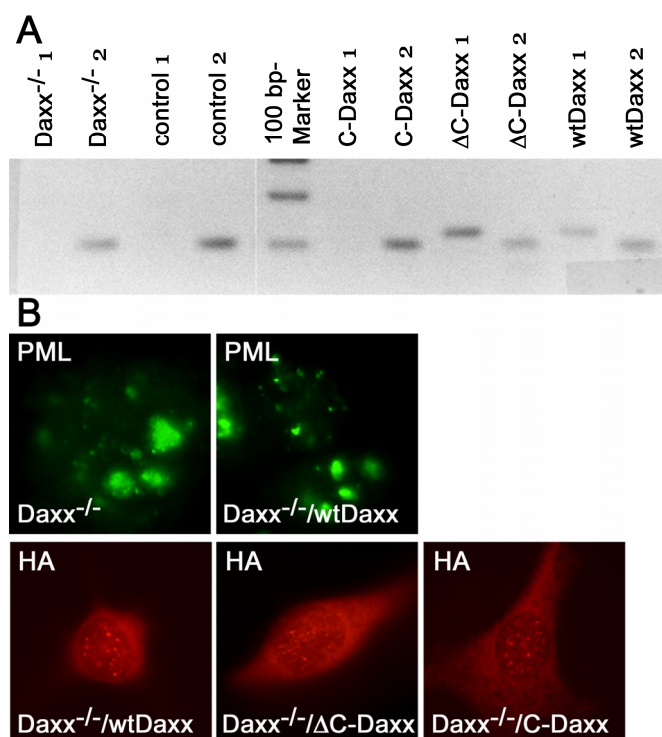


Abb. 17: Kontrolle der $Daxx^{-/-}$ -Zellen und der von ihnen abgeleiteten Zell-Linien

- (A) Aus den $Daxx^{-/-}$ -Zellen, sowie den stabil mit dem Kontroll-Plasmid pBabe („control“), pBabe/C-Daxx („C-Daxx“), pBabe/ Δ C-Daxx („ Δ C-Daxx“) und pBabe/wtDaxx („wtDaxx“) transfizierten $Daxx^{-/-}$ -Zellen wurde RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt. Die Primer-Kombination 1 (GenDaxx227-Up und mDaxxGen4-Down) weist transfiziertes wtDaxx und das Konstrukt Δ C-Daxx nach, wohingegen die Primer-Kombination 2 (GenDaxx227-Up und Neo I) den Gen-*knock-out* bestätigt (Exon 4 bis 7 sind durch ein intaktes Neo-Gen ersetzt).
- (B) Nicht-behandelte $Daxx^{-/-}$ -Zellen, sowie alle davon abgeleitete Zellen wurden mit mAK gegen Maus-PML inkubiert.

Zur weiteren Kontrolle wurden die $Daxx^{-/-}$ -Zellen, sowie die stabil transfizierten Zellen mit einem für Maus-PML spezifischen Antikörper angefärbt. Das PML-Protein zeigte in allen Zelltypen die typische Lokalisation in den ND10, wobei – wie erwartet – ein zwar ähnliches, aber nicht identisches Färbungsmuster wie in z. B. HuTK⁻-Zellen zu finden war (Abb. 17B). Die retransfizierten Konstrukte verfügten über ein HA-Epitop und konnten mit einem Antikörper gegen HA nachgewiesen werden (Abb. 17B).

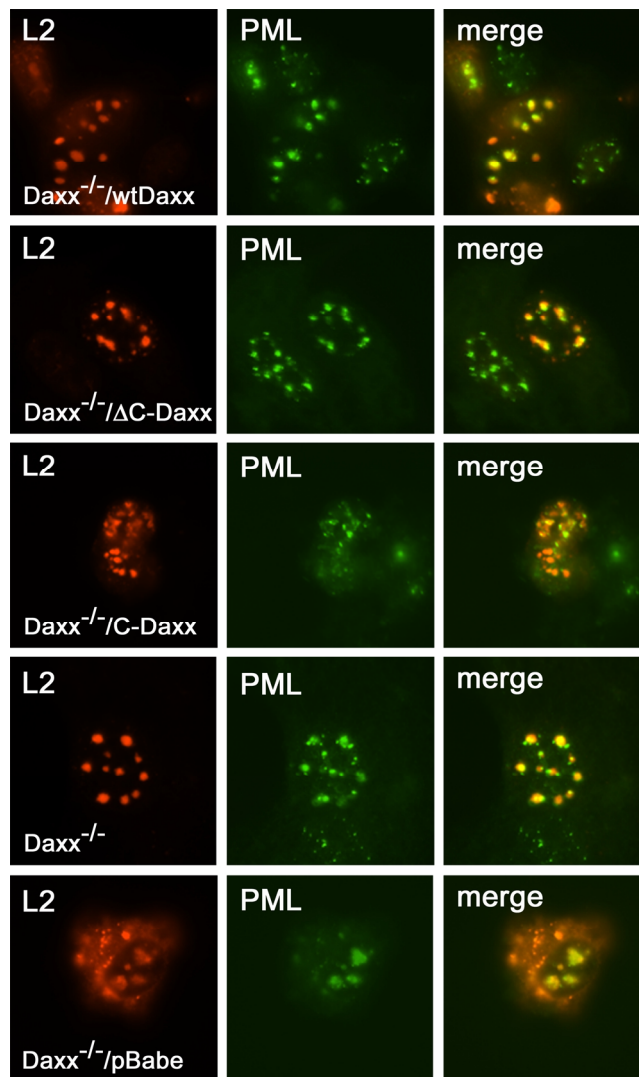


Abb. 18: L2-Lokalisation in $Daxx^{-/-}$ -Zellen

Die $Daxx^{-/-}$ -Zellen und die stabil transfizierten $Daxx^{-/-}$ -Zellen wurden mit vac33L2 infiziert, nach 16 Stunden für die Immunfluoreszenz fixiert und mit dem pAK K28 und mAK α -PML behandelt.

L2 wurde mit Hilfe des Vacciniavirus-Systems in den $Daxx^{-/-}$ -Zellen und den davon abgeleiteten, stabil transfizierten Zellen exprimiert und über Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abb. 18). L2 zeigte in allen untersuchten Zellen die typische Aggregation in ND10, wobei in den $Daxx^{-/-}$ -Zellen und den mit Δ C-Daxx-retransfizierten Zellen die Proteinakkumulation verzögert stattfand. Alle L2-Kernpunkte

kolokalisierten jedoch mit dem PML-Protein. Die Assoziation von L2 mit ND10 ist somit unabhängig von Daxx.

3.2.2.5 L2 interagiert nur mit wtDaxx

Um zu klären, welche Teile von Daxx mit dem L2-Protein interagieren können, wurde L2 in $Daxx^{-/-}$ -Zellen, die mit den unterschiedlichen Konstrukten von Daxx transfiziert waren, exprimiert. Die Analyse im Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach Inkubation der Zellen mit L2- und HA-spezifischen Antikörpern. Überraschenderweise konnte eine Kolokalisation von L2 nur mit dem Vollängenprotein von Daxx nachgewiesen werden. Keines der beiden verkürzten Daxx-Konstrukte zeigte eine gemeinsame Lokalisation bzw. verstärkte Aggregation mit L2 in ND10 (Abb. 19).

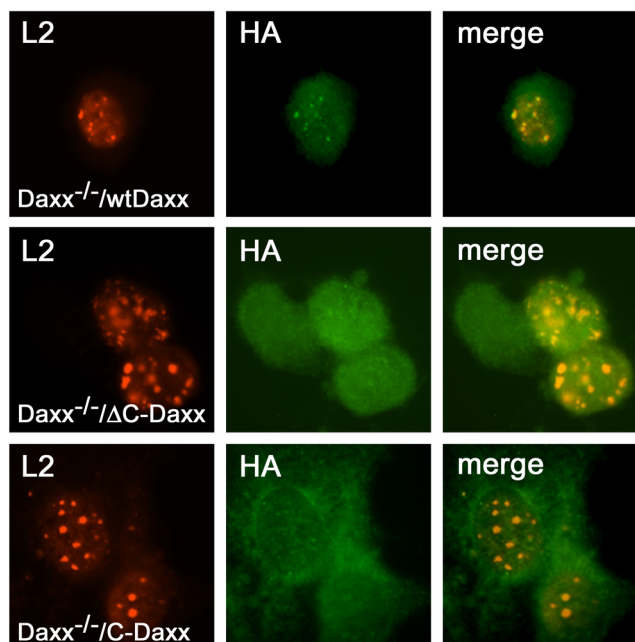


Abb. 19: Nachweis der Daxx-Konstrukte nach L2-Expression

$Daxx^{-/-}$ -Zellen und stabil mit den Daxx-Konstrukten transfizierte $Daxx^{-/-}$ -Zellen, die L2 exprimierten, wurden nach 16 Stunden fixiert und mit dem pAK K28 und einem mAK gegen HA behandelt.

3.3 Die Interaktion von L2 mit dem Kapsidprotein L1

Nach der Reorganisation der ND10 induziert L2 die Rekrutierung von L1 (Abb. 20A) [Day *et al.* 1998; Florin *et al.* 2002a]. Vermutlich kommt es in ND10 durch die Interaktion von L2 mit L1-Kapsomeren zum Zusammenbau der Kapside und der Verpackung der viralen DNA.

Um die Interaktion der beiden Kapsidproteine von HPV33 zu untersuchen, wurden zwei parallele Ansätze gewählt: die Analyse der Rekrutierung von L1 zu ND10 durch L2-Deletions- und Punktmutanten und die Analyse des Einbaus von L2 in VLPs.

Hierzu wurden L2-Mutanten und L1 mit Hilfe rekombinanter Vacciniaviren in HuTK-Zellen exprimiert. Zum einen wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz aufgearbeitet und zum anderen Kernextrakte hergestellt, die über CsCl- und Saccharose-Gradienten aufgereinigt und im Western-Blot analysiert wurden.

3.3.1 L2-induzierte Rekrutierung von L1 in ND10

Die Fähigkeit der L2-Mutanten, L1 in ND10 zu rekrutieren, wurde durch immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen analysiert.

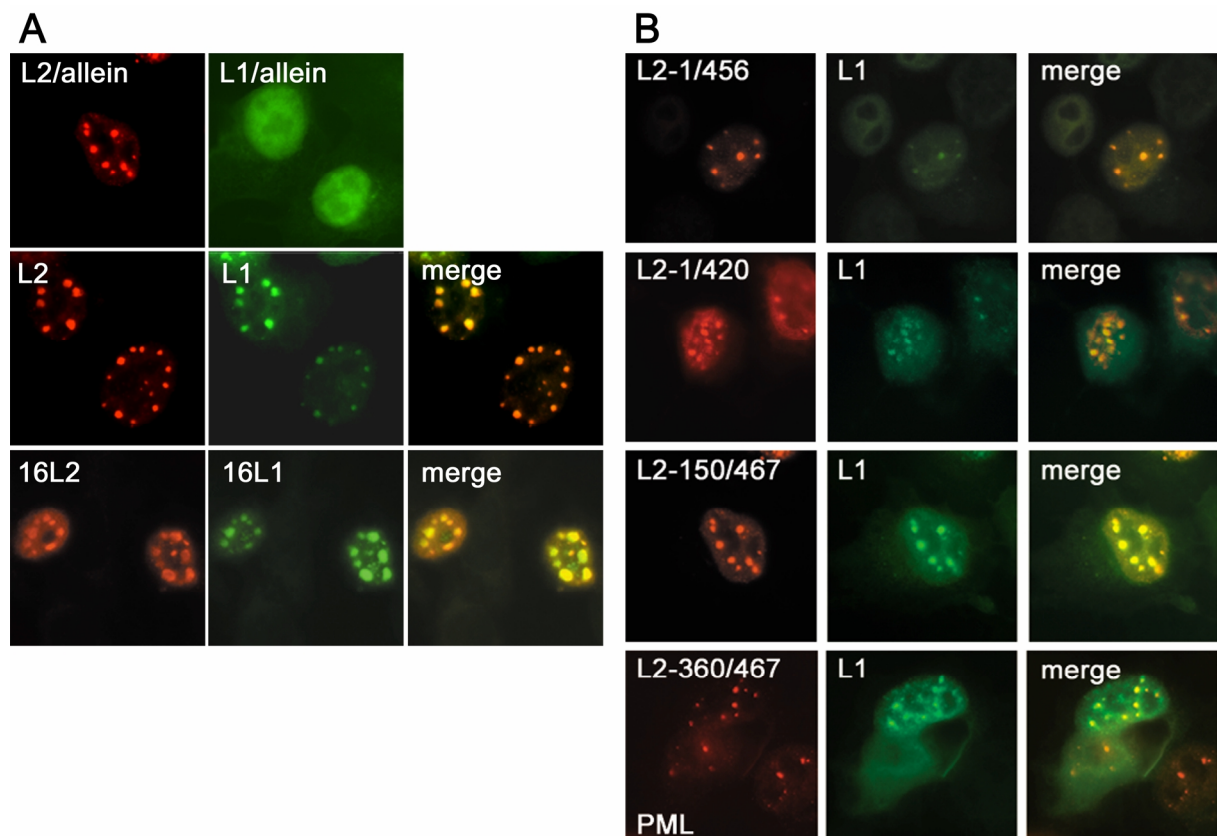


Abb. 20: Nachweis der Kapsidproteine nach alleiniger oder gemeinsamer Expression

- (A) HuTK-Zellen wurden mit vac33L1 oder bzw. und vac33L2 infiziert oder mit den codon-optimierten 16L1- und 16L2-Konstrukten transfiziert. Die HPV33-Kapsidproteine wurden mit dem mA-K L1-7 und dem pAK K28 nachgewiesen, die HPV16-Proteine mit L1-7 und K18.
- (B) L1 und L2-Mutanten wurden exprimiert und mit dem mA-K L1-7 und dem pAK K28 bzw. K233 (im Fall von L2-150/467) nachgewiesen. Im Fall der Mutante L2-360/467 wurden die Zellen mit L1-7 und α -PML behandelt.

Dabei ergab sich, dass alle L2-Mutanten, die ND10 assoziiert waren, L1 auch dorthin rekrutieren konnten. Selbst eine N-terminale Verkürzung des L2-Proteins um bis zu 359 Aminosäuren beeinträchtigte die L1-Rekrutierung in ND10 nicht (Abb. 20B). Auch in diesem Fall konnte die Mutante L2-360/467 nicht mit dem Antikörper detektiert werden. Der Nachweis der L1-Rekrutierung erfolgte indirekt durch Inkubation der Zellen mit den Antikörpern L1-7 und α -PML. Wie zu erwarten, konnte L1 nicht in ND10 beobachtet werden, wenn eine L2-Mutante, die nicht in ND10 lokalisiert, koexprimiert wurde.

Ebenso wie die anderen mit ND10 assoziierten L2-Mutanten waren auch die beschriebenen Prolinmutanten und die Punktmutanten im Aminosäure-Bereich 406 bis 410 in der Lage, L1 in die Kerndomänen zu rekrutieren (Abb. 21).

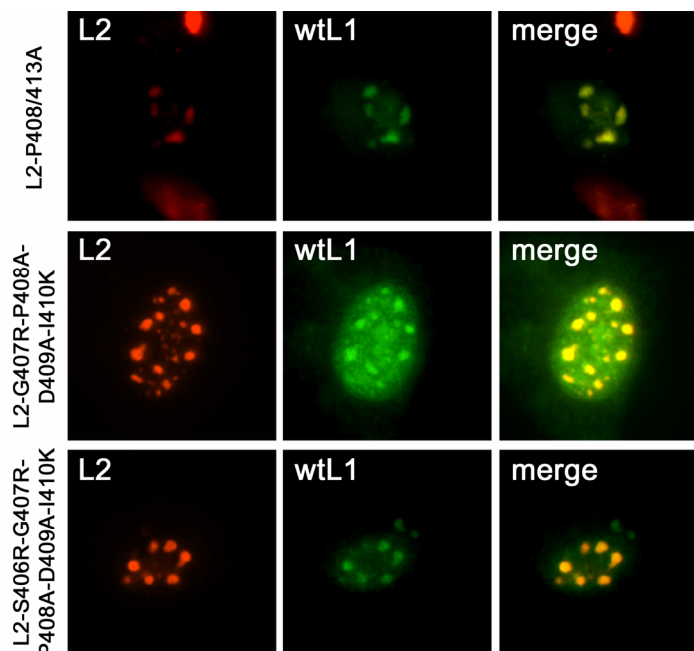


Abb. 21: Nachweis der Kapsidproteine nach Expression von L2-Punktmutanten

HuTK-Zellen wurden mit VTF7-3 und der Mutante vacL2-P408/413A infiziert oder nach VTF7-3-Infektion mit den L2-406/410-Konstrukten transfiziert. Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen mit L1-7 und K28 inkubiert.

3.3.2 L2-Einbau in virusähnliche Partikel (VLPs)

Die Analyse der Saccharose-Gradienten zeigte für das L1-Protein die typische breite Verteilung über den Gradienten: Im oberen Teil sedimentieren Kapsomere, im mittleren Bereich tubuläre und sphärische Partikel und im unteren Teil findet man Aggregate von L1. Die C-terminal verkürzten L2-Mutanten zeigten ein nahezu identisches Sedimentationsverhalten und kosedimentierten mit dem L1-Protein in den VLP-haltigen Fraktionen (Abb. 22A).

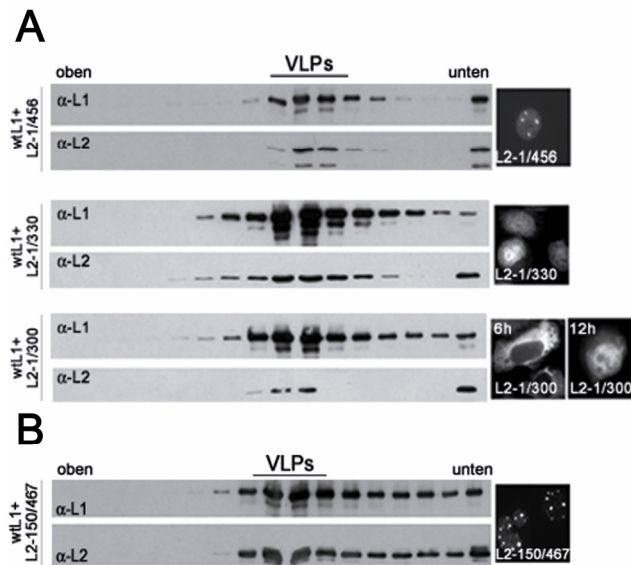


Abb. 22: Interaktionsanalyse der Kapsidproteine in linearen Saccharose-Gradienten

HuTK-Zellen wurden mit vac33L1 und vac33L2-1/456, -1/330 oder -1/300 (A) bzw. mit vac33L1 und vac33L2-150/467 (B) infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden Kernextrakte präpariert und nach einer partiellen Aufreinigung in CsCl-Gradienten in einem Saccharose-Gradienten analysiert. Die Fraktionen wurden in einem L2- und L1-spezifischen WB analysiert (für die L2-Analyse wurde das vierfache Volumen eingesetzt).

Quantitative Auswertungen belegten, dass mit Ausnahme der Mutante L2-1/300 alle Deletionsmutanten mit der gleichen Effizienz in VLPs eingebaut wurden wie wtL2 (Tab. 2). Der geringere Einbau von L2-1/300 in VLPs beruht wahrscheinlich auf der niedrigeren nukleären Konzentration von L2-1/300, das nur durch Diffusion und nicht durch aktiven Transport in den Kern gelangte. Die Tatsache, dass die Mutanten L2-1/300 und L2-1/330 überhaupt in VLPs eingebaut wurden, spricht dafür, dass für die Bildung L2-haltiger VLPs weder die ND10-Lokalisation (Mutante L2-1/330) noch ein aktiver Kerntransport von L2 (Mutante L2-1/300) notwendig ist.

Für die Mutante L2-150/467 konnte der Einbau in VLPs durch Kosedimentation in Saccharose-Gradienten nachgewiesen werden (Abb. 22B). Bei L2-360/467 scheiterte dieser Nachweis wieder an der Unfähigkeit des L2-Antikörpers, das verkürzte Protein zu detektieren. Auffällig bei dem Einbau von L2-150/467 in VLPs war das geringe L1/L2-Verhältnis (Tab. 2). Während dieses Verhältnis normalerweise 30:1 beträgt, was einem Einbau von zwölf L2-Molekülen in ein Kapsid mit 360 L1-Molekülen entspricht, beträgt das Verhältnis nun etwa 5:1. Dies entspricht einem L2-Molekül pro Kapsomer, das aus fünf L1-Proteinen aufgebaut ist.

1/300	Fraktion	L1	L2	L2/4	L1/L2
	8	214,20	6,45	1,61	132,84
	9	292,60	56,52	14,13	20,71
	10	299,40	79,21	19,80	15,12
	Mittelwert				56,22
	Standardabw.				66,41
1/330	Fraktion	L1	L2	L2/4	L1/L2
	7	848,60	116,40	29,10	29,16
	8	1450,00	218,70	54,68	26,52
	9	2454,00	664,20	166,05	14,78
	10	2593,00	682,60	170,65	15,19
	11	2062,00	433,60	108,40	19,02
	12	1672,00	142,00	35,50	47,10
	Mittelwert				25,30
	Standardabw.				12,20
	1/456	Fraktion	L1	L2	L2/4
9		105,70	11,43	2,86	36,99
10		153,30	84,49	21,12	7,26
11		155,20	64,58	16,15	9,61
12		107,00	18,27	4,57	23,43
13		57,86	5,58	1,40	41,48
Mittelwert					23,75
Standardabw.				13,87	
150/467	Fraktion	L1	L2	L2/4	L1/L2
	8	84,44	82,32	20,58	4,10
	9	134,80	119,30	29,83	4,52
	10	168,00	102,40	25,60	6,56
	11	145,20	96,13	24,03	6,04
	12	121,80	75,86	18,97	6,42
	13	88,30	70,31	17,58	5,02
	14	85,31	75,67	18,92	4,51
	15	83,94	79,99	20,00	4,20
	16	58,91	66,45	16,61	3,55
	Mittelwert				4,99
Standardabw.				1,09	

Tab. 2: Quantitative Analyse der L1/L2-VLPs

Für die Ermittlung der Effizienz des L2-Einbaus in VLPs wurden die WBs der Saccharose-Gradienten digitalisiert und die Proteinbanden mit Hilfe der *Kodak 1D image software* (Version 3.5) quantifiziert. Die für L2 erhaltenen Werte wurden durch den Faktor vier dividiert, da für die L2-Analyse das vierfache Probenvolumen eingesetzt wurde. (Die angegebenen Zahlenwerte sind die ermittelten relativen Proteinwerte.)

3.3.3 Mutagenese des HPV11 L1-Interaktionsmotivs

Unter Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems wurde für HPV11 eine L1-Interaktionsdomäne in L2 identifiziert (AS 396 bis 439), die sich durch ihren hydrophoben Charakter auszeichnet. Die Punktmutation der Aminosäuren 417 (Alanin) und 418 (Leucin) zu Glutamat im Peptid HPV11 L2-396/439 bewirkte die vollständige Aufhebung der L1/L2-Interaktion. Bei HPV33 L2 sieht diese Aminosäure-Region ähnlich aus (AS 406 bis 449).

Das Vorhaben war, durch eine Punktmutation nach Finnen *et al.* in einem N-terminal verkürzten L2-Konstrukt, evtl. beide L1-Interaktionsdomänen in HPV33 L2 auszuschalten. Da die N-terminale L1-Interaktionsdomäne (AS 1 bis 300) von L2 sicherlich kürzer ist, als sie durch den Einbau von L2 in VLPs bestimmt werden konnte, wurden die Punktmutationen an den Positionen 427 und 428 in wtL2 und in die Deletionsmutante L2-150/467 eingeführt. Die beiden L2-Konstrukte vac33L2-F427/428E und vac33L2-150/467-F427/428E wurden zusammen mit vac33L1 in HuTK⁻-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen aufgearbeitet und es wurden Kernextrakte hergestellt, die über CsCl- und Saccharose-Gradienten aufgereinigt und im Western-Blot analysiert wurden (Abb. 23).

Beide Punktmutanten konnten in ND10 nachgewiesen werden und verfügten über die Fähigkeit, das L1-Protein in diese Domänen zu rekrutieren (Abb. 23A). Die Analyse ergab weiterhin, dass sowohl die L2-Punktmutante L2-F427/428E als auch das C-terminal verkürzte L2-Protein L2-150/467-F427/428E in VLPs eingebaut wurden (Abb. 23B). Die Mutation der beiden hydrophoben Aminosäuren in der Deletionsmutante L2-150/467 reichte somit nicht aus, um die beiden L1-Interaktionsdomänen in L2 auszuschalten.

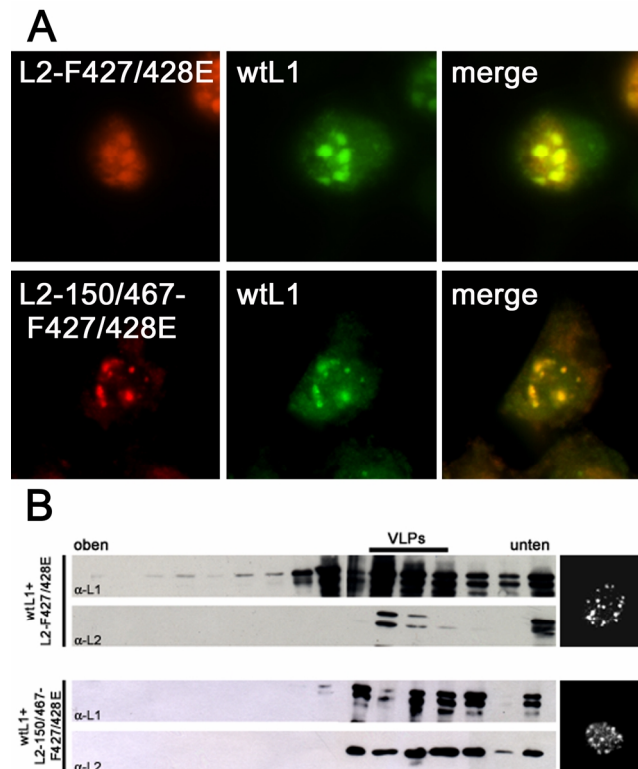


Abb. 23: Untersuchung der L1-Interaktionsdomänen in L2

- HuTK-Zellen wurden mit VTF7-3, vacL1 und den angegebenen vacL2-Konstrukten infiziert.
- (A) Die Zellen wurden zwölf Stunden nach Infektion mit dem mA-K L1-7 und dem pAK K233 behandelt.
- (B) 48 Stunden nach Infektion wurden Kernextrakte aus den infizierten Zellen hergestellt und diese in analytischen Saccharose-Gradienten untersucht. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem L2- und L1-spezifischen WB analysiert (für die L2-Analyse wurde das vierfache Probenvolumen eingesetzt).

3.3.4 L1/L2-Interaktion in PML-negativen Zellen

Wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt, rekrutieren alle L2-Mutanten, die in ND10 lokalisieren, auch L1 dorthin. Weiterhin ergab sich, dass keine ND10-Assoziation der Kapsidproteine vorliegen muss, um den L2-Einbau in Kapside zu gewährleisten. Es wurde untersucht, ob das Vorhandensein von ND10 trotzdem eine Voraussetzung für die Interaktion zwischen L1 und L2 ist.

Die alleinige Expression von L1 resultierte auch in PML^{-/-}-Zellen in einer diffusen Kernverteilung des Proteins. Bei Koexpression mit L2 akkumulierte es nach zehn Stunden nahezu vollständig in den L2-haltigen Kernaggregaten (Abb. 24A), was auf eine Interaktion der beiden Kapsidproteine in den PML^{-/-}-Zellen hindeutet.

Es wurde weiterhin untersucht, ob diese Kolokalisation zu einer funktionellen Interaktion zwischen den beiden Kapsidproteinen führt. Um dies zu überprüfen, wurde der L2-Einbau in VLPs nach Koexpression der beiden Kapsidproteine untersucht. Die VLPs

wurden aus den Kernen von PML^{-/-}-Zellen und den PEF-Kontrollzellen extrahiert, durch Gleichgewicht-Dichtegradienten-Zentrifugation partiell aufgereinigt und in einem linearen Saccharose-Gradienten analysiert. Als Kontrolle dienten Extrakte aus Zellen, die nur L2 exprimierten.

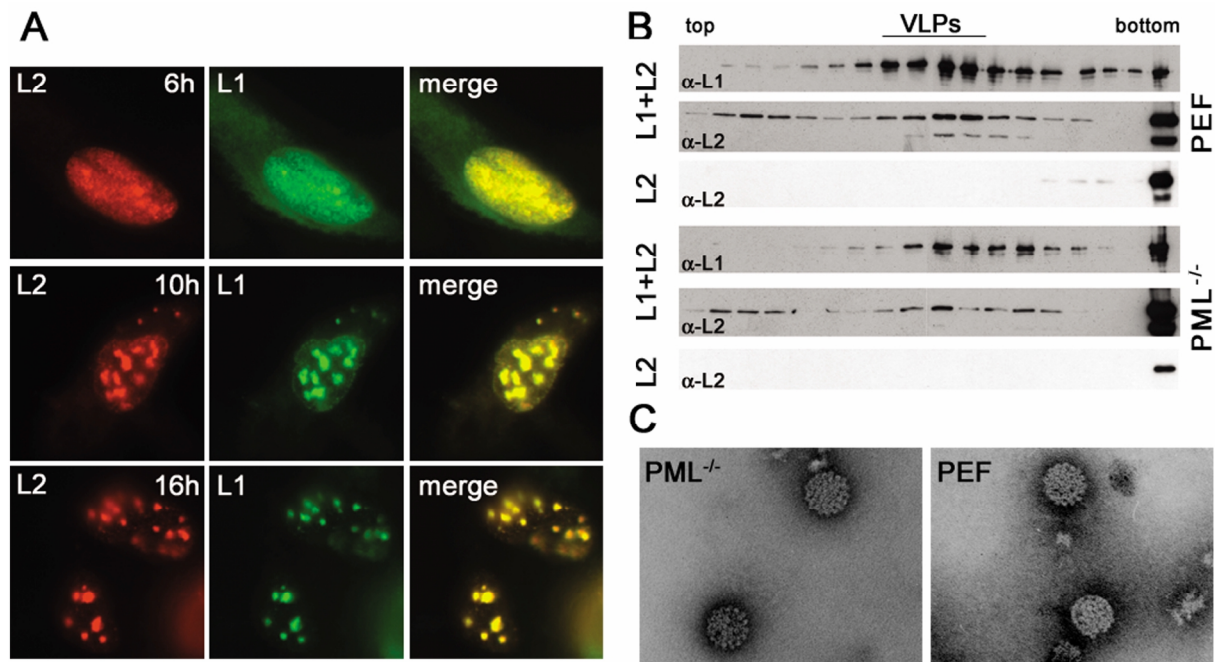


Abb. 24: L1- und L2-Expression in PML^{-/-}- und PEF-Zellen

PML^{-/-}- und PEF-Zellen wurden mit vacL1 und vacL2 infiziert.

- (A) L1- und L2-exprimierende PML^{-/-}-Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit L1-7 und K28 inkubiert.
- (B) Kernextrakte wurden aus PML^{-/-}- und PEF-Zellen, die entweder beide Kapsidproteine oder nur das L2-Protein exprimierten, gewonnen. Nach einer partiellen Aufreinigung durch CsCl-Dichte-Zentrifugation wurden die Proben in Saccharose-Gradienten aufgetrennt und die Fraktionen im L1- und L2-spezifischen WB analysiert (für die L2-Analyse wurde das zwölffache Probenvolumen eingesetzt).
- (C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VLPs, die in PML^{-/-}- und PEF-Zellen hergestellt wurden.

Auch in den PEF-Zellen zeigte das L1-Protein die typische breite Verteilung über den Gradienten (Abb. 24B). Das L2-Protein zeigte ein nahezu identisches Sedimentationsverhalten. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man bei der Analyse von VLPs, die in PML^{-/-}-Zellen gebildet wurden. Dagegen wurde L2 ausschließlich im Sediment gefunden, wenn keine Koexpression mit L1 stattfand. Das spricht für eine Aggregation von L2-Proteinen, wie man sie in allen bisher untersuchten Zelllinien gefunden hat.

Zur weiteren Charakterisierung der VLPs wurden die Fraktionen 9 bis 11 der Saccharose-Gradienten vereinigt und nach einer weiteren Zentrifugation in einem CsCl-Stufengradienten im Elektronenmikroskop untersucht. Abbildung 24C bestätigt, dass

sowohl in den PEF- als auch den PML^{-/-}-Zellen VLPs gebildet wurden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Einbau von L2 in VLPs kein PML-Protein benötigt. Weiterhin wurde die Effizienz der VLP-Bildung und des relativen L2-Einbaus in die VLPs in den beiden Zelllinien quantitativ verglichen. Hierfür wurden die Western-Blots der CsCl-Stufengradienten und der Saccharose-Gradienten digitalisiert und die L1- und L2-spezifischen Banden mit Hilfe der *Kodak 1D image software* (Version 3.5) quantitativ erfasst. Der relative Gehalt an L1-Protein in den VLP-haltigen Fraktionen des CsCl-Stufengradienten wurde mit den für die Expression eingesetzten Zellzahlen korrigiert. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied für die VLP-Ausbeute in PML^{-/-}- und PEF-Zellen (Tab. 3).

PEF	Fraktion	L1	L2	L2/12	L1/L2
	7	75,81	23,04	1,92	39,49
	8	133,00	53,00	4,42	30,11
	9	148,10	80,28	6,69	22,14
	10	155,20	133,40	11,12	13,96
	11	163,80	129,30	10,77	15,20
	12	130,00	66,75	5,56	23,37
	13	121,90	46,99	3,92	31,13
	14	104,90	16,61	1,38	75,79
	Mittelwert				31,40
	Standardabw.				18,55

PML ^{-/-}	Fraktion	L1	L2	L2/12	L1/L2
	9	80,41	52,18	4,35	18,49
	10	144,60	101,3	8,44	17,13
	11	101,00	23,76	1,98	51,01
	12	104,00	42,66	3,55	29,26
	13	134,40	70,07	5,84	23,02
	14	54,30	41,48	3,46	15,71
	Mittelwert				25,77
	Standardabw.				12,15

	VLP _{ges}	Korrekturfaktor	korrigiert
PML ^{-/-}	199,1	1	199,1
PEF	177,4	2,35	416,89
PEF/PML ^{-/-}			2,09

Tab. 3: Quantitative Analyse der L1/L2-VLPs aus PML^{-/-}- und PEF-Zellen

Für die Ermittlung der VLP-Ausbeuten in PML^{-/-}- und PEF-Zellen wurden die WB der CsCl-Stufengradienten (nicht gezeigt) digitalisiert und die Proteinbanden der VLPs mit Hilfe der *Kodak 1D image software* (Version 3.5) quantifiziert. Der für die PEF-Zellen erhaltene Wert wurde mit dem Faktor 2,35 multipliziert, da für die Analyse der PML^{-/-}-Zellen das 2,35-fache Probenvolumen eingesetzt wurde. Für die Quantifizierung des L2-Einbaus in VLPs wurde mit den WBs der Saccharose-Gradienten ebenso verfahren und die L2-Werte mit dem Faktor zwölf korrigiert. (Die angegebenen Zahlenwerte sind die ermittelten relativen Proteinwerte.)

Für die Analyse des L1/L2-Verhältnisses in den VLPs aus beiden unterschiedlichen Zelllinien wurden die Western-Blots der Saccharose-Gradienten eingescannt und die L1- und L2-Protein-Banden quantifiziert. Schließlich wurden die erhaltenen Werte für das unterschiedliche bei der SDS-PAGE eingesetzte Probenvolumen korrigiert. Wie in allen bisher untersuchten Zelllinien ergab sich ein L1/L2-Verhältnis von ca. 30 L1-Molekülen zu einem L2-Molekül (Tab. 3). Die Interaktion von L1 und L2 resultierte somit im Einbau von L2 in VLPs, wobei kein PML-Protein und somit auch keine ND10 erforderlich waren. Auch das L1/L2-Verhältnis entsprach dem in natürlichen Virionen gefundenen Wert von 30:1.

3.3.5 L1/L2-Interaktion in Daxx-negativen Zellen

Weiterhin wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen L1 und L2 von Daxx abhängig ist. Zwar konnte gezeigt werden, dass Daxx für die ND10-Lokalisation von L2 nicht benötigt wird. Ob das zelluläre Protein jedoch für die L1/L2-Interaktion notwendig ist, war damit noch nicht geklärt. Die beiden Kapsidproteine wurden zusammen in den *Daxx*^{-/-}-Zellen und den daraus abgeleiteten Zelllinien exprimiert. Der Nachweis mit L1- und L2-spezifischen Antikörpern zeigte, dass L2 in jeder dieser untersuchten Zelllinie in der Lage ist, L1 in die PODs zu rekrutieren (Abb. 25). Daxx ist demnach weder für die subnukleäre Lokalisation von L2 noch für die L2-induzierte Rekrutierung von L1 notwendig.

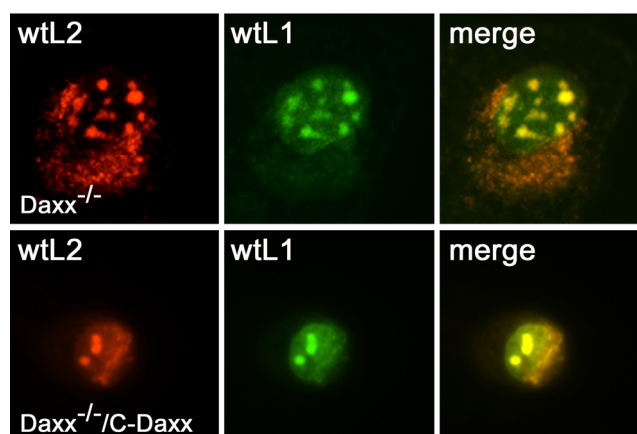


Abb. 25: L1/L2-Interaktion in Daxx^{-/-}-Zellen

Daxx^{-/-}-Zellen und davon abgeleitete Zellen wurden mit vac33L1 und vac33L2 infiziert, fixiert und mit den Antikörpern L1-7 und K28 inkubiert. Beispielhaft für alle Ergebnisse sind nur die *Daxx*^{-/-}-Zellen und *Daxx*^{-/-}/C-Daxx-Zellen gezeigt.

3.3.6 Analyse der L1/L2-Interaktion im Cytoplasma

Es wurde gezeigt, dass keine spezifische Lokalisation im Kern und weder PML noch Daxx benötigt werden, um eine Interaktion zwischen L1 und L2 zu ermöglichen. Um die Möglichkeit der L1/L2-Interaktion im Cytoplasma zu analysieren, wurde das cytoplasmatisch lokalisierte L1-Protein L1 Δ NLS (L1-1/470, dem das Kernlokalisations-signal am C-Terminus des L1-Proteins fehlt) zusammen mit verschiedenen L2-Mutanten exprimiert. Bekannt war, dass die Koexpression von wtL2 mit dem kerntransport-defizienten L1-Protein den Kerntransport beider Proteine ermöglicht und L2 in L1 Δ NLS-VLPs eingebaut wird [Paintsil *et al.* 1996; Florin *et al.* 2002b]. Dagegen konnte keine der getesteten L2-Mutanten, die über eine NDLD verfügte, den Kerntransport und die Anreicherung von L1 Δ NLS in ND10 induzieren (Abb. 26A). Selbst Mutanten mit nur kurzen Deletionen (L2-12/467 oder L2-1/456) waren nicht dazu in der Lage.

Weiterhin wurde der Einbau von L2-Proteinen in L1 Δ NLS-VLPs durch Kosedimentationsanalysen untersucht, wobei die Bildung der VLPs aus L1 Δ NLS durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden konnte (Abb. 26B). Diese Kapside unterscheiden sich von den wtL1-VLPs durch erhöhte Variabilität in Form und Größe, bilden sich jedoch mit ähnlicher Effizienz wie wtL1-VLPs. Außer für wtL2 konnte für keines der L2-Konstrukte ein Einbau in die cytoplasmatischen VLPs nachgewiesen werden. In den Western-Blots der Saccharose-Gradienten konnten die verschiedenen L2-Proteine nur im Sediment nachgewiesen werden, genau wie bei alleiniger Expression von L2 (Abb. 26C). Selbst wtL2 wurde mit geringerer Effizienz in diese VLPs eingebaut. Wie zu erwarten war, wurde keines der L2-Proteine, die nicht mit L1 Δ NLS kolokalisierten, in diese VLPs eingebaut. Aber auch die Mutante L2-1/300, die aufgrund des fehlenden NLS primär gemeinsam mit L1 Δ NLS im Cytoplasma angereichert ist, wurde nicht in die cytoplasmatischen VLPs eingebaut.

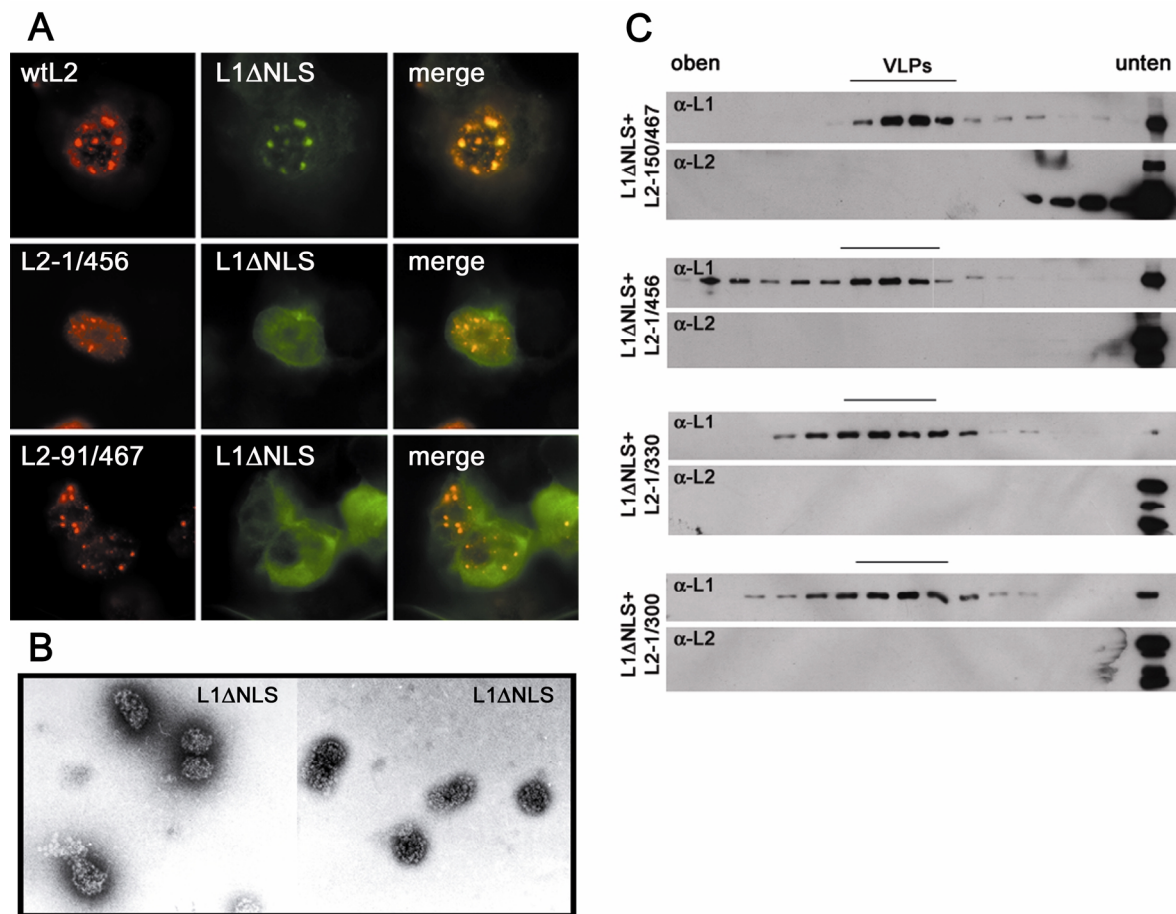


Abb. 26: L1/L2-Interaktion im Cytoplasma

HuTK-Zellen wurden mit VTF7-3, vacL1ΔNLS und den angegebenen vacL2-Konstrukten infiziert.

(A) Die Zellen wurden zwölf Stunden nach Infektion mit dem mAK L1-7 und dem pAK K28 bzw. K233 (L2-150/467) behandelt.

(B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VLPs aus den Kapsidproteinen L1-ΔNLS und L2.

(C) 48 Stunden nach Infektion wurden Kernextrakte präpariert und analytischen Saccharose-Gradienten unterworfen. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem L2- und L1-spezifischen WB analysiert (für die L2-Analyse wurde das vierfache Probenvolumen eingesetzt).

Somit wird klar, dass der vollständige VLP-Zusammenbau auf den Kern beschränkt, aber nicht auf eine bestimmte Lokalisation im Kern angewiesen ist. Dies folgt u. a. daraus, dass auch NDLD-defiziente L2-Mutanten wie L2-12/390 in VLPs eingebaut werden (s. 3.3.2). Außerdem deutet alles darauf hin, dass die Interaktion von L1 und L2 im Kern eine andere ist als die im Cytoplasma, da auch diejenigen Mutanten, die mit L1 im Kern L1/L2-VLPs bilden, nicht in der Lage sind, mit L1 im Cytoplasma zu interagieren.

3.4 Die Interaktion von L2 mit dem Chaperon Hsc70

3.4.1 Cytoplasmatische Retention von L2 durch den Proteasomen-Inhibitor MG132

Der Proteasomen-Inhibitor MG132 (N-CBZ-Leu-Leu-Leucinal; SIGMA) verhindert die Proteolyse von Proteinen, die für den Abbau vorgesehen sind. Wird dieser Inhibitor nach der Infektion von Zellen mit vac33L2 zugegeben, bewirkt er die Retention des L2-Proteins im Cytoplasma der Zellen, d. h. der normalerweise stattfindende Kerntransport wird dadurch verhindert [Florin *et al.* 2002a]. Die Retention ist auch zu beobachten, wenn codon-optimiertes 16L2-Protein unter MG132-Einfluss exprimiert wird (Abb. 27).

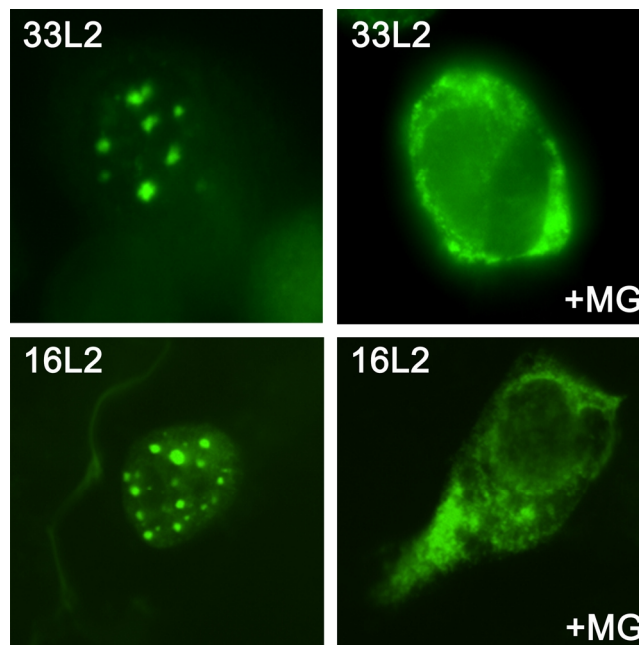


Abb. 27: L2-Expression unter MG132-Einfluss

HuTK-Zellen wurden mit vac33L2 und VTF7-3 infiziert oder mit dem codon-optimierten 16L2 transfiziert. Der Proteasomen-Inhibitor wurde drei Stunden nach Infektion bzw. Transfektion zugegeben. Die Zellen wurden für weitere sechs Stunden kultiviert und nach der Fixierung mit dem Antikörper L2-1 inkubiert.

Zur Aufklärung dieser völlig unerwarteten und unverstandenen Beobachtung sollte zuerst der hierfür verantwortliche L2-Bereich kartiert werden. Dazu wurden verschiedene L2-Mutanten mittels des Vacciniavirus-Transfersystems exprimiert und die Zellen drei Stunden nach Infektion mit MG132 behandelt. Weitere sechs Stunden später wurden die Zellen fixiert. Die Lokalisation der L2-Konstrukte wurde mit L2- und PML-spezifischen Antikörpern in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Abb. 28). Alle untersuchten N-terminalen Deletionsmutanten zeigten in Anwesenheit von MG132 die gleiche cytoplasmatische Retention wie wtL2. Dagegen reichte schon eine

Verkürzung von elf Aminosäuren am C-Terminus aus, um den Effekt auf L2 zu verhindern. Alle C-terminal verkürzten L2-Konstrukte wurden in Anwesenheit von MG132 in den Kern transportiert.

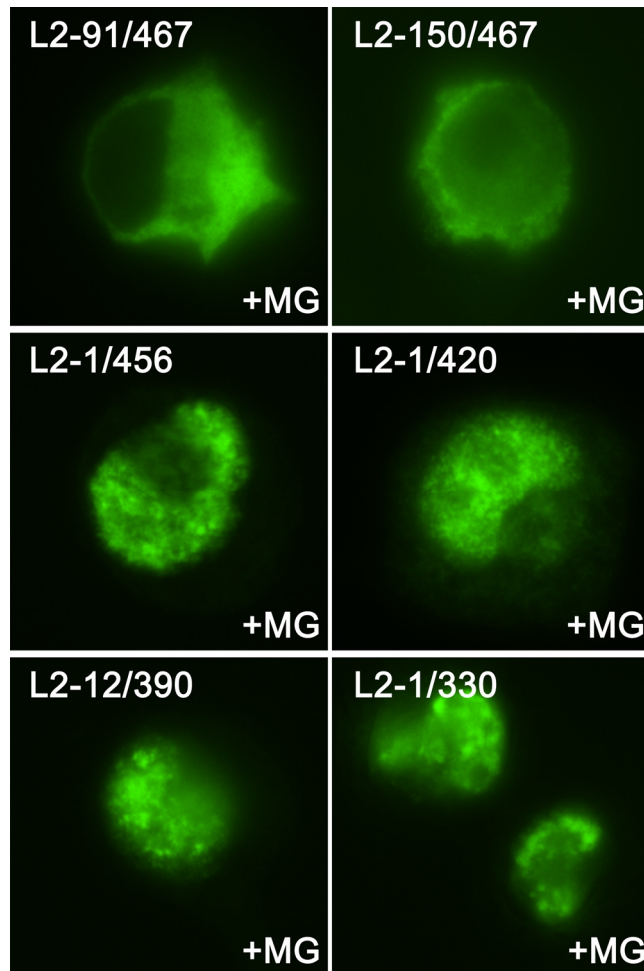


Abb. 28: Expression von L2-Mutanten unter MG132-Einfluss

HuTK-Zellen wurden mit VTF7-3 und den angegebenen vacL2-Mutanten infiziert und MG132 drei Stunden nach Infektion zugesetzt. Die Zellen wurden neun Stunden nach Infektion fixiert und mit dem Antikörper L2-1 behandelt.

Frühere Vermutungen [Florin 2002], dass die für den MG132-Effekt verantwortliche L2-Sequenz am äußersten C-Terminus liegt, konnten somit bestätigt werden.

3.4.2 Der C-Terminus von L2 wird vor dem Kerntransport nicht abgespalten

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Notwendigkeit einer C-terminalen proteolytischen Spaltung von L2 vor dem Kerntransport. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein HA-Epitop an den C-Terminus von HPV16 L2 angehängt. Dieses Konstrukt wurde in Zellen exprimiert, und die Zellen wurden nach ca. 16 Stunden für die

Immunfluoreszenz fixiert. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit L2- und HA-spezifischen Antikörpern (Abb. 29).

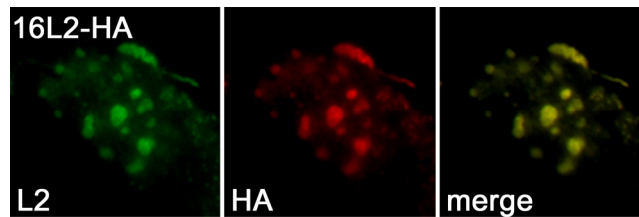


Abb. 29: Expression von 16L2-HA: Proteolyse vor dem Kerntransport von L2?

HuTK-Zellen wurden mit dem 16L2-HA-Konstrukt transfiziert und nach 16 Stunden für die Immunfluoreszenz fixiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit L2-1 und α -HA.

Das L2-Protein und das HA-Epitop erschienen gleichzeitig im Kern und konnten in ND10 nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der C-Terminus von L2 vor dem Kernimport nicht abgespalten wird.

3.4.3 Hsc70 wird mit L2 in den Kern transportiert

Die Behandlung mit MG132 übt einen Stress auf Zellen aus, ähnlich wie ein Hitzeschock. So kommt es zur Translokation des konstitutiv exprimierten Chaperons Hsc70 in die Nukleoli betroffener Zellen [Lewis and Pelham 1985; Florin *et al.* 2004]. Das Fehlen von cytoplasmatischem Hsc70 in MG132-behandelten Zellen könnte die Ursache für die Retention von L2 im Cytoplasma sein. Zudem zeigten Versuche im Rahmen dieser Arbeit, dass L2 nur im Zellkern, nicht aber im Cytoplasma in VLPs eingebaut wird. Dies ließ vermuten, dass L2 im Cytoplasma an ein Protein oder an mehrere Proteine gebunden ist, welche die Interaktion mit L1 verhindern. Die Kombination dieser Ergebnisse legte die Vermutung nahe, dass Hsc70 möglicherweise mit L2 im Cytoplasma interagiert.

In unbehandelten Zellen ist Hsc70 homogen über das Cytoplasma der Zellen verteilt (Abb. 30). Die Expression von L2 und L2-Mutanten, die in ND10 lokalisieren, führte zur drastischen Umverteilung von Hsc70, das mit L2 in ND10 akkumulierte. Auch die Expression von wtL1 bewirkte die Lokalisation von Hsc70 im Kern (Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen auf eine Interaktion und den gemeinsamen Kerntransport der Kapsidproteine und Hsc70 schließen.

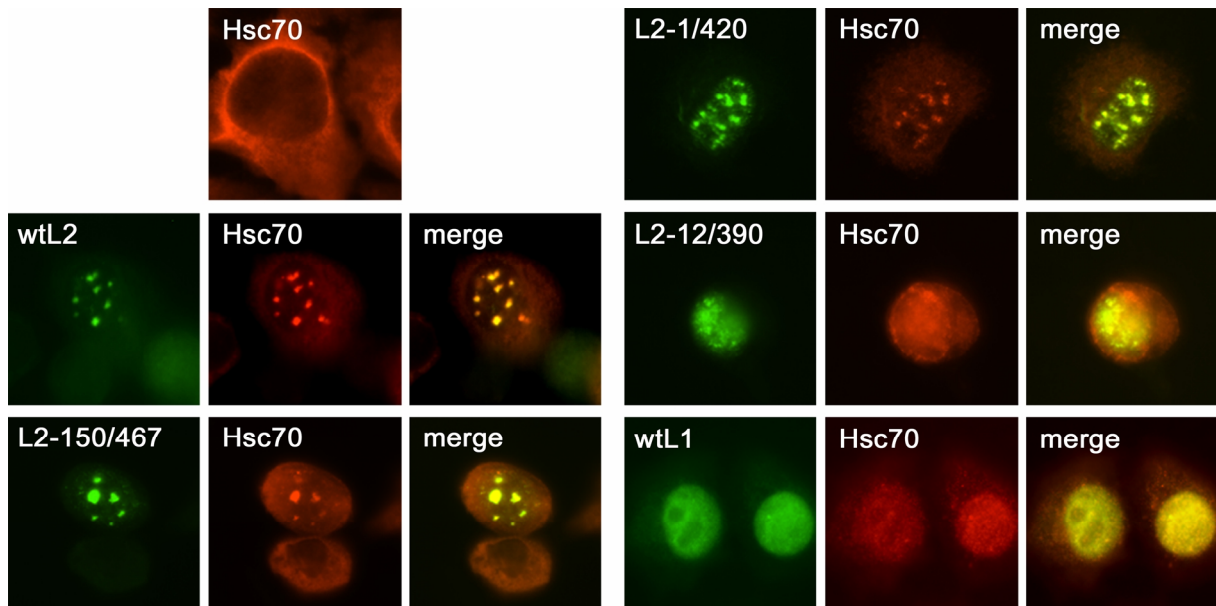


Abb. 30: Nachweis des zellulären Chaperons Hsc70 nach L2- und L1-Expression
 HuTK-Zellen wurden mit VTF7-3 und den angegebenen Vaccinia-Konstrukten der HPV-Kapsidproteine infiziert. Die Zellen wurden nach neun Stunden fixiert und mit Antikörpern gegen L2 und Hsc70 inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen, die mit dem mAK gegen Hsc70 behandelt wurden.

3.4.4 Hsc70 wird in VLPs, nicht aber in Pseudovirionen eingebaut

Da das Chaperon vermutlich am Kerntransport der Kapsidproteine beteiligt ist, wurde untersucht, ob auch in VLPs und/oder Pseudovirionen eine Assoziation der Kapsidproteine mit Hsc70 vorliegt. Hierzu wurden VLPs, die sich nur aus L1 oder aus L1 und verschiedenen L2-Proteinen zusammensetzten, sowie Pseudovirionen, die L1, L2 und das Markerplasmid GFP/GFP-NLS enthielten, nach Aufreinigung über Cäsiumchlorid-Gradienten in analytischen Saccharose-Gradienten untersucht.

Bei VLPs, die nur aus L1-Molekülen aufgebaut waren, konnte keine Assoziation mit Hsc70 festgestellt werden (Abb. 31). Das Chaperon wurde nur in den obersten vier Fraktionen nachgewiesen, wohingegen die VLPs hauptsächlich in den Fraktionen neun bis zwölf sedimentierten. Dagegen kosedimentierten Hsc70 und das Kochaperon Hsp40 teilweise mit L1/L2-VLPs. Interessanterweise ging die Hsc70-Assoziation mit L1/L2-VLPs verloren, wenn C-terminal verkürztes L2 (L2-1/456 oder L2-1/420) in den VLPs eingebaut wurde. Dagegen blieb sie aber erhalten, wenn N-terminal verkürztes L2 (L2-150/467) verwendet wurde. Diese Ergebnisse weisen auf eine Interaktion zwischen Hsc70 und dem C-Terminus von L2 in VLPs hin.

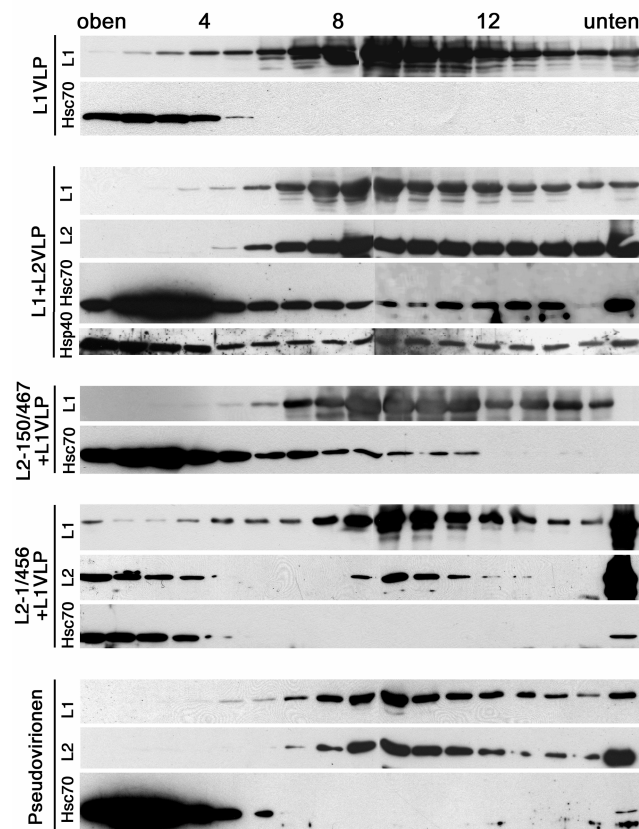


Abb. 31: Hsc70-Nachweis in VLPs und Pseudovirionen

wtL1 wurde allein oder zusammen mit wtL2 oder L2-Mutanten exprimiert. Aus den Zellen wurden nach 48 Stunden Kernextrakte hergestellt. Nach Aufreinigung durch CsCl-Dichte-Zentrifugation wurden die Proteine in Saccharose-Gradienten aufgetrennt und in L2-, Hsc70- und Hsp40-spezifischen WBs analysiert.

Überraschend war zudem die Beobachtung, dass die Hsc70/L2-Assoziation in Pseudovirionen nicht mehr nachweisbar war (Abb. 31). Der Einbau von DNA ging somit mit dem Verlust von Hsc70 einher.

3.5 Die Mikrotubuli-Assoziation von L2 nach MG132-Behandlung

3.5.1 Kolokalisation von L2 und α -Tubulin unter MG132-Einfluss

Die cytoplasmatische Retention von L2 in Abwesenheit von Hsc70 lässt sich zum einen durch eine unspezifische Aggregation von L2, zum anderen durch eine spezifische Interaktion von L2 mit cytoplasmatischen Komponenten erklären. Da sich wtL2 und L2-1/456, das keine cytoplasmatische Retention in Anwesenheit von MG132 zeigt, nur um elf Aminosäuren unterscheiden, scheint die erste Möglichkeit eher unwahrscheinlich. Auf eine spezifische Interaktion von L2 mit Mikrotubuli deuteten erste immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen hin. Es konnte eine Kolokalisation

von wtL2 mit α -Tubulin in MG132-behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 32). In HuTK⁻-Zellen, die L2 exprimierten und nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden, konnte keine Assoziation des viralen Proteins mit dem Mikrotubuli-Netzwerk detektiert werden.

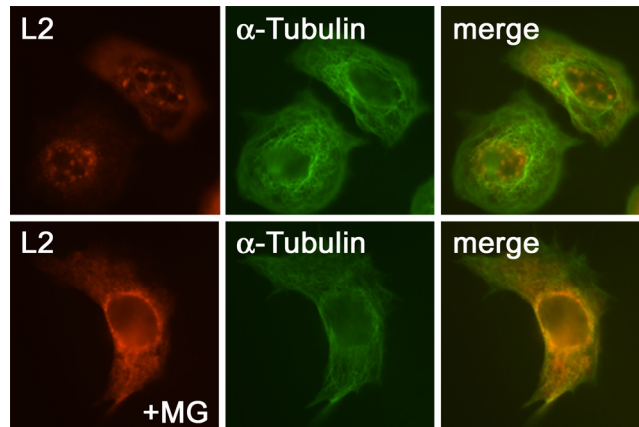


Abb. 32: L2/Mikrotubuli-Assoziation unter MG132-Einfluss

L2-exprimierende HuTK⁻-Zellen wurden unbehandelt oder nach MG132-Behandlung fixiert und mit dem pAK K28 und einem mAK gegen α -Tubulin inkubiert.

3.5.2 Nocodazol hebt den MG132-Effekt auf

Diese Beobachtungen konnten durch den Einsatz von Nocodazol bestätigt werden. Nocodazol ist eine Substanz, die Mikrotubuli zerstört, indem sie die Tubulin-Stränge depolarisiert und zur Auflösung des Filament-Netzwerkes führt. Wurden HuTK⁻-Zellen, die L2 exprimierten, vor der MG132-Behandlung zusätzlich mit Nocodazol inkubiert, so konnte in immunfluoreszenz-mikroskopischen Analysen festgestellt werden, dass die Retention aufgehoben werden konnte und L2 komplett in die ND10 transportiert wurde (Abb. 33). Kontrollen zeigten, dass Nocodazol keinen Einfluss auf die Kernlokalisierung und ND10-Akkumulation von L2 in Abwesenheit von MG132 hatte. Diese Daten demonstrieren, dass ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk notwendig ist, um L2 nach MG132-Behandlung im Cytoplasma zurückzuhalten, dass L2 aber unabhängig von Mikrotubuli in den Kern transportiert wird.

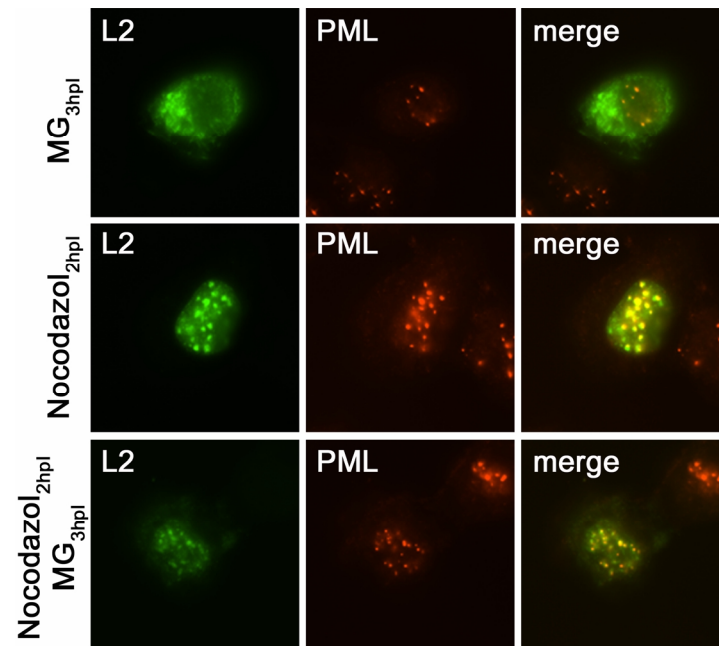


Abb. 33: Nocodazol-Einfluss auf den MG132-Effekt

L2-exprimierende HuTK⁻-Zellen wurden nach den angegebenen Zeiten mit den Inhibitoren MG132, Nocodazol oder einer Kombination der beiden Substanzen inkubiert (z.B.: MG_{3hpl}=MG132-Zugabe drei Stunden nach Infektion) und nach neun Stunden fixiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen L2 und PML.

4 Diskussion

Mit dieser Arbeit sollten weitere Einblicke in die Morphogenese von Papillomviren, speziell von HPV33, erlangt werden. Ziel war, v. a. die Domänen innerhalb des L2-Proteins zu charakterisieren, die für die ND10-Lokalisation des Proteins, für die Rekrutierung weiterer viraler Komponenten und für die Reorganisation der ND10 verantwortlich sind. Auf zellulärer Ebene wurden Faktoren untersucht, die an der Virus-Morphogenese beteiligt sind.

4.1 Die Lokalisation von L2 im Kern

4.1.1 Die ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD)

Neben dem kartierten Kernlokalisierungssignal (Aminosäure-Region 295 bis 316) und einem vermutlich entbehrlichen NLS am C-Terminus (Aminosäuren 350 bis 356) von L2 [Sun *et al.* 1995; Florin 2002] muss eine Region in L2 für die Lokalisation in ND10 verantwortlich sein.

Mit Hilfe von Deletionsmutanten und L2/GFP-Fusionsproteinen gelang die Identifizierung einer 22 Aminosäuren langen Region in L2, welche die ND10-Lokalisation bewirkt. Die Region weist häufig bei Protein/Protein-Interaktionen auftretende PxxP-Motive auf und beinhaltet die hochkonservierte Sequenz SGPDI. Detaillierte Punktmutationen in diesem Bereich zeigten jedoch, dass weder die Proline innerhalb der NDLD noch das SGPDI-Motiv essenziell für die Lokalisation von L2 in ND10 sind.

Trotz gelungener Eingrenzung der NDLD auf einen kurzen Sequenzabschnitt in L2 konnten die für die ND10-Lokalisation verantwortlichen Aminosäuren nicht identifiziert werden. Dies kann bedeuten, dass diese Aminosäuren noch zur genauen Charakterisierung ausstehen. Eine andere Möglichkeit aber ist, dass die gesamte NDLD zur subzellulären Lokalisation von L2 beiträgt.

Der Einsatz der L2/GFP-Fusionsproteine zeigte zudem, dass Sequenzen C- oder N-terminal der NDLD für die ND10-Lokalisation gebraucht werden. Sie können zur Stabilisierung einer bestimmten Struktur dieser L2-Region beitragen. Dies kann darauf hindeuten, dass nicht lineare Sequenzabschnitte, sondern ein bestimmtes konformationelles Element in L2 die Protein/Protein-Wechselwirkung vermittelt.

Allerdings ist es dann überraschend, dass die Mutation von Prolin, eine die Konformation stark beeinflussende Aminosäure, keinen Einfluss auf die ND10-Lokalisation hat.

Frühere Arbeiten mit HCMV E1, einem früh während des Infektionszyklus synthetisiertes Protein, ergaben, dass die ND10-Lokalisation dieses Proteins nicht durch einen bestimmten Sequenzabschnitt vermittelt wird. In HCMV E1 sind mehrere funktionelle Domänen involviert [Ahn *et al.* 1998; Wilkinson *et al.* 1998]. Für die ND10-Lokalisation verschiedener Proteine scheinen viele Mechanismen in Frage zu kommen und es ist keine NDLD-Konsensus-Sequenz bekannt. Nur bei einer geringen Anzahl bisher untersuchter zellulärer und viraler Proteine konnte die Art der ND10-Assoziation aufgeklärt werden [Ishov *et al.* 1999; Li *et al.* 2000a; Hofmann *et al.* 2002; Ishov *et al.* 2002].

PML selbst ist entscheidend für den Aufbau der ND10. Die Stabilität dieser Kernstrukturen scheint von dem Status der SUMO-1-Modifikation von PML abhängig zu sein [Muller *et al.* 1998], obwohl der Einsatz von PML-Mutanten, denen alle SUMO-1-Modifikationsstellen fehlten, kontroverse Ergebnisse lieferte [Ishov *et al.* 1999; Lallemand-Breitenbach *et al.* 2001]. Sp100 ist neben PML eine weitere Hauptstrukturkomponente der ND10 [Sternsdorf *et al.* 1997a] und interagiert nicht direkt mit PML [Koken *et al.* 1994]. Es konnte gezeigt werden, dass die SUMO-1-Modifikation von Sp100 keine Voraussetzung für die ND10-Lokalisation dieses Proteins darstellt [Sternsdorf *et al.* 1999]. Die NDLD von Sp100 konnte auf eine ca. 100 Aminosäuren lange Region am N-Terminus des Proteins eingeengt werden. Sie beinhaltet das Protein-Motiv HSR (*homogeneously staining region*), das in mehreren Proteinen zu finden ist [Grötzinger *et al.* 1996]. Eine Homologie zu der L2-NDLD besteht jedoch nicht und auch der Mechanismus der ND10-Rekrutierung von Sp100 ist weiterhin ungeklärt [Sternsdorf *et al.* 1999].

Daxx ist ein Protein, das sowohl im Heterochromatin als auch in ND10 zu finden ist. Der SUMO-1-Modifikationsstatus von Daxx hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins in ND10 [Jang *et al.* 2002]. Dagegen scheint für die Daxx-Assoziation mit ND10 die SUMO-Modifikation von PML entscheidend zu sein [Ishov *et al.* 1999]. Es wird spekuliert, dass Daxx u. a. eine Rolle als Adapterprotein erfüllt und andere Komponenten, die nicht direkt mit PML interagieren können, in ND10 rekrutiert [Ishov *et al.* 1999]. Dieses Szenario einer indirekten Assoziation wird für viele zelluläre und virale

Proteine angenommen. Auch im Fall des viralen Tegumentproteins pp71 von HCMV fungiert Daxx als Adaptermolekül zu PML [Hofmann *et al.* 2002; Ishov *et al.* 2002]. Daxx kann über seinen C-Terminus mit PML und über eine weiter N-terminal gelegene Aminosäure-Region mit pp71 interagieren. Ähnliches mag auch für L2 zutreffen. Nur wtDaxx wird durch L2 in ND10 rekrutiert, d. h. beide Interaktionsdomänen von Daxx (N- und C-Terminus), von denen gezeigt wurde, dass sie unabhängig voneinander Protein/Protein-Wechselwirkungen eingehen können, sind notwendig. Allerdings scheint Daxx in diesem Fall nicht das einzige Adaptermolekül zu sein, da L2 auch in Daxx-negativen Zellen in ND10 akkumuliert. Eine direkte Interaktion zwischen L2 und PML besteht vermutlich nicht. In vorherigen Analysen konnte keine Koimmunpräzipitation von L2 und PML nachgewiesen werden (L. Florin, unveröffentlichte Daten). Um dagegen eine direkte Interaktion von Daxx und L2 zu bestätigen und um die genauen Interaktionsdomänen einzugrenzen, müssten *in vitro* Versuche mit Retikulozyten-Extrakten zur Herstellung dieser beiden Proteine mit nachfolgender Immunpräzipitation durchgeführt werden.

Die NDLD von L2 beinhaltet somit wahrscheinlich überlappende Motive für die Akkumulation des Proteins in ND10. Darauf weist auch die Erkenntnis hin, dass eine Mutation der hochkonservierten SGPDI-Sequenz keinen Einfluss auf die ND10-Lokalisation von L2 hat. Möglich ist auch die Beteiligung mehrerer Adapter, die miteinander interagieren und von denen mindestens ein Interaktionspartner direkte PML-Assoziation zeigt. Genaue Analysen möglicher L2-Interaktionspartner und evtl. auch von L2-Modifikationen könnten Aufschluss über den Mechanismus der ND10-Lokalisation von L2 geben.

4.1.2 L2 bildet unabhängig von PML Kernaggregate

Die strukturbildende Komponente der ND10 ist das PML-Protein. Bei Verlust der ND10 durch gezielte Zerstörung des PML-Proteins [Wang *et al.* 1998; Ishov *et al.* 1999] kommt es zu einer Umverteilung der ND10-lokalisierten Proteine [Ishov *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000a]. Untersuchungen in PML-negativen Zellen ergaben, dass L2 auch in Abwesenheit von ND10 in der Lage ist, selbst organisierte Proteinaggregate im Zellkern zu bilden. Diese L2-Ansammlungen sind insofern funktionell, als sie ebenso wie PML-assoziiertes L2 in der Lage sind, Daxx und das Kapsidprotein L1 zu rekrutieren.

Frühe Genprodukte einer Vielzahl von DNA-Viren, wie Cytomegaloviren (HCMV), Epstein-Barr Viren (EBV), Herpes Simplex Viren (HSV) und Adenoviren, lokalisieren in ND10 [Ishov and Maul 1996; Sternsdorf *et al.* 1997a; Adamson and Kenney 2001]. Sie induzieren die Zerstörung oder vollständige Reorganisation der ND10 durch den Verlust der SUMO-1-Modifikation von PML oder den proteolytischen Abbau von PML und/oder Sp100 [Everett and Maul 1994; Koriath *et al.* 1996; Ahn *et al.* 1998; Everett *et al.* 1998; Muller and Dejean 1999; Parkinson and Everett 2000]. Nach der Zerstörung der ND10 konnte bei Herpes Simplex Viren erstaunlicherweise die Rekrutierung von PML zu den viralen Replikationskompartimenten gezeigt werden [Burkham *et al.* 2001].

Nach Infektion einer Zelle muss ein Virus in der Lage sein, gegebene Voraussetzungen in der Zelle zu nutzen oder aber zelluläre Faktoren für die anfängliche Replikation und Transkription zu rekrutieren. ND10 scheinen ein geeignetes Milieu für die virale Transkription darzustellen [Ishov *et al.* 1997], und man geht davon aus, dass die Zerstörung der ND10 mit der Freisetzung bestimmter zellulärer Proteine einhergeht, die für einen produktiven Lebenszyklus „großer DNA-Viren“ notwendig sind.

Im Gegensatz zu den „großen DNA-Viren“ scheinen „kleine DNA-Tumoviren“ ND10 zu nutzen, ohne sie zu zerstören. So wurde bei SV40 beobachtet, dass die Replikation in oder nahe bei ND10 stattfindet [Ishov and Maul 1996; Tang *et al.* 2000]. Auch die Replikation von Papillomviren ist mit ND10 assoziiert. Die HPV-Proteine E1 und E2 sind in die virale Replikation involviert und tragen zur ND10-Lokalisation des HPV-Genoms bei [Swindle *et al.* 1999].

Entgegen bisheriger Berichte konnte nun auch bei einem Papillomvirus-Typ, i. e. HPV1, die Zerstörung der ND10 nachgewiesen werden [Roberts *et al.* 2003]. Das relativ spät während der Infektionsphase exprimierte E4-Protein induziert die Relokalisation von PML aus ND10 an die Peripherie von E4-Einschlusskörperchen im Kern. HPV1 ist aber im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit untersuchten HPV33 kein krebsverursachendes Virus; die Infektion führt zu gutartigen Warzen an Händen und Füßen. E4 ist zudem das am wenigsten konservierte HPV-Protein. Es ist also möglich, dass E4 von HPV1 und HPV33 unterschiedliche Funktionen erfüllen. Betrachtet man HPV33-infiziertes Gebärmutterhals-Gewebe, so kann man auch in den späten Differenzierungsstadien von infizierten Keratinozyten die Kolo-kalisation von L2 und PML beobachten [Florin 2002; Florin *et al.* 2002b]. Ebenso konnte in einem Zellkultursystem, in dem autonome Replikation des viralen Genoms und die Expression aller viraler Proteine möglich ist,

gezeigt werden, dass BPV1 L2 in ND10 lokalisiert und somit ND10 trotz Expression der Nicht-Strukturproteine vorliegen [Day *et al.* 1998]. Die bei HPV1 nachgewiesene PML-Rekrutierung an die „blasenartigen“ E4-Einschlusskörper müsste optisch deutlich von der PML-Lokalisation in ND10 zu unterscheiden sein. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass bei Expression der HPV33-Kapsidproteine intakte ND10 vorliegen.

4.1.3 Die Reorganisation von ND10

Das Kapsidprotein L2 lokalisiert nicht nur in ND10, sondern induziert auch die Reorganisation der Kernstrukturen. Einem Arbeitsmodell zufolge soll L2 durch diese Reorganisation die Voraussetzungen für den effektiven Abschluss der Virus-Morphogenese schaffen [Florin 2002; Florin *et al.* 2002b]. L2 rekrutiert nach diesem Modell den Transkriptionsrepressor Daxx in ND10 und induziert den Ausschluss des transkriptionellen Aktivators Sp100 aus ND10, um die virale Replikation und Transkription zu beenden. Daraufhin wird das Kapsidprotein L1 in ND10 rekrutiert und der Zusammenbau der Kapside geht mit der Verpackung des zu einem Minichromosom kondensierten viralen Genoms einher.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass alle L2-Mutanten, die in ND10 lokalisieren, auch die Reorganisation dieser Domänen induzieren können. Der während der heterologen Expression zu beobachtende L2-induzierte Sp100-Ausschluss aus ND10 ist auch in infiziertem Gewebe nachgewiesen worden [Florin *et al.* 2002b]. Dies bekräftigt die Ergebnisse der Zellkulturversuche.

Der Ausschluss von Sp100 aus ND10 durch dort lokalisierende L2-Mutanten legt nahe, dass die Beeinflussung dieses zellulären Proteins unmittelbar in den ND10 geschieht und nicht durch räumlich hiervon getrennte Prozesse vermittelt wird. Sp100 wird neben PML als eine weitere Hauptstrukturkomponente der ND10 angenommen [Koken *et al.* 1994; Sternsdorf *et al.* 1997a]. Entgegen früherer Experimente nimmt man inzwischen an, dass die NDLD und die Oligomerisierungsdomäne von Sp100 nicht identisch sind, sondern nebeneinander im Protein liegen [Sternsdorf *et al.* 1999; Negorev *et al.* 2001]. Somit könnten ND10-lokalisierte Sp100-Proteine weitere Sp100-Proteine binden und in Assoziation zu PML ein eigenständiges Netzwerk aufbauen. Diese Vorstellung wird auch von folgenden Ergebnissen unterstützt: PML- und Sp100-Proteine, die sich bei Blockade des proteolytischen Abbaus anhäufen, scheinen individuell in ND10

„abgesondert“ zu werden. Beide Proteine nehmen innerhalb von ND10 ihren eigenen Platz ein [Everett *et al.* 1999]. Man findet Sp100-Aggregate auch außerhalb von ND10: Sie enthalten kein PML, sind hochdynamisch und können mit ND10 „verschmelzen“ [Wiesmeijer *et al.* 2002].

Es stellt sich die Frage, ob L2 Sp100 in ND10 strukturell verdrängt bzw. direkt ersetzt. So könnte L2 genau wie Sp100 eine eigene Proteinstruktur aufbauen, die zwar mit ND10 assoziiert, jedoch nicht damit identisch ist. Ebenso wie für Sp100 und PML konnte auch für L2 und PML durch Koimmunpräzipitationsanalysen keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen werden (L. Florin, unveröffentlichte Daten). L2 würde demnach eine in der Zelle vorhandene Struktur nutzen, um von dort aus ein geeignetes Milieu für die Virus-Morphogenese zu errichten.

Ebenso könnten an dem Prozess des Sp100-Ausschlusses aber zusätzliche unbekannte Faktoren beteiligt sein, die durch L2 ebenfalls in ND10 rekrutiert werden oder dort lokalisieren. Wie für HPV16 bekannt, kolokalisiert L2 in ND10 noch mit anderen zellulären Proteinen und ist zudem in der Lage, die ND10-Lokalisation von mindestens zwei weiteren zellulären Proteinen zu induzieren [Görnemann *et al.* 2002].

Zusätzlich zu der strukturellen Eigenschaft von Sp100 muss die transkriptionsaktivierende Wirkung des Proteins berücksichtigt werden. Sp100 kann direkt mit Mitgliedern der Heterochromatin-Familie und anderen Nicht-Histon-Proteinen interagieren [Lehming *et al.* 1998; Seeler *et al.* 1998] und besitzt transkriptionsmodulierende Eigenschaften [Seeler *et al.* 2001]. Zudem interagiert Sp100 physikalisch und funktionell mit ETS-1, einem Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass Sp100 als neuartiger Koaktivator fungiert und zu diesem Zweck aus den ND10 an die Orte der Transkription rekrutiert wird [Wasylyk *et al.* 2002]. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Kapsidproteine exprimiert werden und der Sp100-Ausschluss aus ND10 stattfindet, beginnt der letzte Teil im Infektionszyklus von HPV. Die Transkription der viralen DNA muss beendet und die fertigen Virionen müssen zusammengebaut werden. Die L2-induzierte Verdrängung von Sp100 aus ND10 könnte den transkriptionsfördernden Charakter dieses Milieus zerstören und die Verpackung des viralen Genoms ermöglichen. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von Sp100 in der HPV-Morphogenese hin.

Im Gegensatz zu dem Sp100-Protein kann bei dem transkriptionellen Modulator Daxx eine L2-induzierte Rekrutierung in ND10 beobachtet werden. Die für diese Veränderung verantwortliche L2-Region liegt innerhalb der ermittelten NDLD. Außerdem konnte ein gemeinsames Anwachsen der L2-Aggregate und Daxx über ND10 hinaus festgestellt werden. Daxx und L2 interagieren zwar unabhängig von PML miteinander, Daxx ist jedoch, wie schon erwähnt, nicht das einzige Adaptermolekül zwischen L2 und PML. Die Untersuchungen mit Daxx-negativen Zellen, die mit wtDaxx oder Teilkonstrukten von Daxx transfiziert worden waren, ergaben, dass L2 nur mit wtDaxx, nicht aber mit dem C-Terminus oder den Aminosäuren 1 bis 620 von Daxx interagiert. Dies spricht dafür, dass die L2/Daxx-Interaktion nur dann funktioniert, wenn beide L2-Interaktionsdomänen in Daxx vorhanden sind und diese Wechselwirkung nicht durch ein (bisher unbekanntes) drittes Protein ersetzt wird.

Es werden immer weitere Proteine identifiziert, die mit Daxx interagieren können, seinen Phosphorylierungsstatus und seine Lokalisation ändern und/oder somit Einfluss auf die Transkription nehmen können. In verschiedenen B-Zelllinien wirkt sich Daxx entweder positiv oder negativ auf die Pax5-vermittelte Transkription aus [Emelyanov *et al.* 2002]. Die direkte Protein/Protein-Wechselwirkung von Daxx mit ETS-1 und Pax3 inhibiert die Wirkung der Transkriptionsfaktoren [Hollenbach *et al.* 1999; Li *et al.* 2000b]. Daxx interagiert mit seinem C-Terminus u. a. direkt mit Histon-Deacetylasen. Dies bewirkt die Kondensation von Chromatin [Li and Chen 2000]. Durch die alternative Interaktion mit PML wird Daxx in ND10 rekrutiert und kann unter normalen Umständen seine Funktion als Transkriptionsrepressor nicht mehr ausüben [Li *et al.* 2000a].

Im Fall einer HPV-Infektion kann die Rekrutierung von Daxx in ND10 vermutlich lokal die Beendigung der viralen Replikation und Transkription vermitteln. Das Ergebnis wäre das Loslösen des viralen Genoms von nukleären Strukturen und die Verpackung zu einem Minichromosom. Die Voraussetzungen für die Virionen-Zusammenlagerung wären damit gegeben.

Diese Situation der L2-abhängigen ND10-Reorganisation trifft vermutlich nicht für alle Papillomvirus-Typen zu. Die bei HPV1 beobachtete E4-induzierte Zerstörung der ND10 verursacht schon vor der Expression der Kapsidproteine die Verteilung der ND10-Komponenten im Nukleoplasma bzw. die Lokalisation dieser Proteine an alternativen Stellen im Zellkern. Inwieweit Sp100 in diesem Fall an der viralen Replikation und Transkription beteiligt ist, bleibt zu klären. Denkbar wäre jedoch eine ND10-

unabhängige Assoziation von PML und Sp100 an Orten der viralen Replikation und Transkription ebenso wie der Ausschluss von Sp100 aus diesen viralen „Fabriken“ bei Beginn der L2-Expression. Da die Interaktion zwischen L2 und Daxx nicht ND10-abhängig ist, kann die L2-induzierte Daxx-Rekrutierung auch dann stattfinden, wenn die ND10 durch die E4-Expression zerstört wurden. Ob es Parallelen während der produktiven Infektionsphase von Papillomviren gibt oder ob grundlegende Unterschiede zwischen den Papillomvirus-Typen bestehen, stellt eine interessante Frage für weitere Forschungsarbeiten dar.

4.2 Die Interaktion der Kapsidproteine L1 und L2

Die Kapsidproteine von HPV werden in den letzten Differenzierungsstadien infizierter Keratinozyten synthetisiert. Die Interaktion zwischen L1, L2 und dem viralen Genom resultiert in der Produktion reifer Virionen [Howley and Lowy 2001]. Die im Cytoplasma synthetisierten Kapsidproteine von Papillomviren werden im Gegensatz zu den Kapsidproteinen von Polyomaviren [Delos *et al.* 1993; Forstova *et al.* 1993; Barouch and Harrison 1994; Ishii *et al.* 1994] unabhängig voneinander in den Zellkern transportiert. Die Interaktion zwischen L2 und L1-Kapsomeren findet normalerweise nicht schon im Cytoplasma der infizierten Zellen statt [Florin 2002; Florin *et al.* 2002a].

Es steht außer Frage, dass eine direkte Interaktion zwischen L1 und L2 stattfindet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die zellulären Voraussetzungen ebenso wie beteiligte und notwendige Regionen des L2-Proteins für die Interaktion der Kapsidproteine untersucht werden. Die Interaktion von L2 und L1 wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert: durch die L2-spezifische L1-Rekrutierung in ND10 und durch den Einbau von L2 in VLPs.

4.2.1 L1 und L2 interagieren unabhängig von PML miteinander

Bisher konnte keine ND10-Zerstörung nach HPV33-Infektion beobachtet werden. L2 rekrutiert das Kapsidprotein L1 in ND10 und nur durch den Einbau von L2 in Kapside lassen sich die L2-Proteine von der zellulären Matrix extrahieren. Man geht davon aus, dass der Zusammenbau der Kapside und der Einbau des viralen Genoms in den ND10 stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass L2-Proteine, die in PML-negativen Zellen selbst organisierte Kernstrukturen bilden, L1-Proteine rekrutieren.

Auch der Einbau von L2 in VLPs fand unabhängig von dem PML-Protein statt. Dass Papillomviren in ND10 replizieren [Swindle *et al.* 1999] und andere Viruskomponenten L2-induziert ebenfalls dort akkumulieren [Day *et al.* 1998; Florin *et al.* 2002a], lässt darauf schließen, dass Papillomviren diese Kernkompartimente nutzen, um eine erhöhte lokale Konzentration der Virusprodukte zu erzielen. Falls dies eine notwendige Voraussetzung für die effiziente Virus-Morphogenese darstellt, so ist sie auch im Fall der PML-negativen Zellen vorhanden. L2 baut eine funktionelle Struktur im Kern dieser Zellen auf, welche die Interaktion mit viralen und zellulären Bestandteilen weiterhin ermöglicht.

Der L2-Einbau in VLPs, der in PML^{-/-}-Zellen ebenso effizient wie in PML-haltigen Zellen stattfand, zeigt, dass die beiden Kapsidproteine nicht notwendigerweise an eine zelluläre Struktur gebunden vorliegen müssen. Diese Ergebnisse dürfen jedoch nicht überbewertet werden. Da die Herstellung von Pseudovirionen in PML-negativen Zellen ebenso wie in PEF-Zellen mit dem im Labor um M. Sapp etablierten System fehlschlug, kann keine Aussage über den Einbau von DNA in die Kapside gemacht werden. Es ist möglich, dass die Assoziation der viralen Komponenten mit ND10 eine Voraussetzung für den Einbau der viralen DNA in die Kapside darstellt. Nicht veröffentlichte Daten aus dem Labor um J. Schiller (USA) unterstützen die Annahme einer wichtigen Funktion von PML für den Lebenszyklus von Papillomviren. PML-defiziente Zellen, die im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten nicht mit SV40 T-Antigen transformiert waren, wurden mit BPV1-Pseudovirionen infiziert. Diese Pseudovirionen enthielten HA-Epitop markiertes L2-Protein und ein GFP-Plasmid. L2 und die Marker-DNA konnten im Kern der infizierten Zellen nachgewiesen werden, eine Expression des GFP-Plasmids dagegen nicht. Wurden diese Zellen allerdings mit wtPML retransfiziert, so konnte die Expression des Marker-Plasmids beobachtet werden (P. Day, unveröffentlichte Daten). Somit scheinen virale Replikation und Transkription zumindest einzelner Papillomviren von der ND10-Assoziation der viralen Proteine und des viralen Genoms abzuhängen.

4.2.2 Der L2-Einbau in VLPs erfordert die Kernlokalisierung von L1 und L2

Der L2-Einbau in VLPs bedarf weder der ND10-Lokalisation der Kapsidproteine noch des Vorliegens selbst organisierter L2-Aggregate im Kern. Dagegen konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die klare Notwendigkeit einer Kernlokalisierung aufzeigen. Dies wird am offensichtlichsten bei Verwendung von L2-1/300 und L1 Δ NLS, deren

Kolokalisation im Cytoplasma zur Ausbildung von VLPs, nicht aber L2-haltiger VLPs führt. Diese L2-Mutante wird effizient eingebaut, wenn der VLP-Zusammenbau im Kern erfolgt. Es war vorab bekannt, dass sich L1-Proteine spontan und unabhängig von der subzellulären Lokalisation zu Kapsomeren und Kapsiden zusammenlagern [Paintsil *et al.* 1996]. VLPs bilden sich auch in Bakterien und zellfreien Systemen [Kawana 1998; Touze and Coursaget 1998; White *et al.* 1998]. Die Notwendigkeit einer spezifischen subzellulären Lokalisation für die Bildung L2-haltiger Partikel ist daher umso erstaunlicher.

Die Kapsidproteine von Polyomaviren werden im Cytoplasma synthetisiert und Kapsomere aus VP1 in Assoziation mit den anderen Kapsidproteinen in den Kern transportiert. Im Gegensatz zu dem L1-Protein von Papillomviren lokalisiert VP1 des Vogel-Polyomavirus' APV im Cytoplasma und kann bei alleiniger Expression keine VLPs bilden. Erst die Interaktion mit anderen Kapsidproteinen ermöglicht den Kernimport von APV VP1. Die Lokalisation der Proteine im Kern stellt die Voraussetzung für die Kapsidbildung dar [Johne and Muller 2004].

Warum nur die ungekürzten HPV-Kapsidproteine im Cytoplasma miteinander interagieren [Florin 2002], bleibt zum derzeitigen Forschungsstand Spekulationen und weiteren Untersuchungen überlassen. Die Voraussetzungen für eine L1/L2-Interaktion sind demnach in Cytoplasma und Kern unterschiedlich. Verschiedene Interaktionspartner könnten zum einen Interaktionsdomänen maskieren, zum anderen aber auch die Quartärstruktur eines oder beider Proteine beeinflussen. Ein möglicher Kandidat ist das Chaperon Hsc70, das mit beiden Kapsidproteinen assoziiert ist.

4.2.3 L2 besitzt mindestens zwei L1-Interaktionsdomänen

Neben der Erkenntnis, dass die Lokalisation der Kapsidproteine im Kern notwendige Voraussetzung für die Produktion L1- und L2-haltiger Kapside ist, konnte aus den Experimenten mit den mutierten Kapsidproteinen eine weitere wesentliche Information gezogen werden. HPV33 L2 verfügt mindestens über zwei unabhängig voneinander interagierende L1-Bindungsdomänen, deren Existenz schon seit langem angenommen wurde und die für BPV1 L2 bestätigt werden konnten [Sapp *et al.* 1995; Okun *et al.* 2001]. Diese Domänen liegen innerhalb der Aminosäuren 1 und 300 bzw. 360 und 467 in HPV33 L2. Sie wurden mit unterschiedlichen Methoden, nämlich zum einen mit Hilfe der L2-spezifischen L1-Rekrutierung in ND10 (L2-360/467) und zum anderen mit Hilfe

des L2-Einbaus in VLPs (L2-1/300), identifiziert. Da diese L1-Interaktionsdomänen in L2 beide einen relativ langen Aminosäure-Bereich umfassen, ist es möglich, dass sich mehr als zwei Interaktionsregionen darin befinden. Somit kann es sein, dass in der Mutante L2-150/467-F427/428E [Finnen *et al.* 2003] zwar zwei L1-Interaktionsdomänen zerstört sind, weitere dagegen noch erhalten sind. Für BPV1 L2 konnten die zwei L1-Interaktionsdomänen auf die Aminosäure-Regionen 129 bis 246 und 384 bis 460 festgelegt werden [Okun *et al.* 2001]. Mutanten mit internen Deletionen innerhalb der ersten 300 Aminosäuren könnten weitere Interaktionsdomänen in L2 aufdecken. Der Einsatz dieser L2-Mutanten in unterschiedlichen Interaktionsanalysen könnte zudem Einsicht in die Komplexität der L1/L2-Interaktion geben und zeigen, ob beide untersuchten Wechselwirkungen zwischen L1 und L2 (L1-Rekrutierung in ND10 und L2-Einbau in VLPs) gleichzeitig verloren gehen würden.

Bestätigt es sich, dass auch in HPV33 L2 die C-terminale L1-Interaktion durch die hydrophoben Aminosäuren 427 und 428 vermittelt wird, hätte man zusätzlich die L1-Interaktionsdomäne von der NDLD (AS 399 bis 420) im L2-Protein getrennt. Außerdem lassen die Ergebnisse in BPV1 L2 vermuten, dass sich eine L1-Interaktionsdomäne am N-Terminus von HPV33 L2 an die Aminosäure-Region (AS 1-150) anschließt, die das L1/L2-Verhältnis in VLPs festsetzt.

Welche Teile des L2-Proteins zuerst und wie diese mit L1 bzw. den fertigen Kapsomeren interagieren, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären. Hierzu wäre eine weitere Eingrenzung der L1-Interaktionsdomänen in L2 vorzunehmen und die Bedeutung der Domänen während des Kapsid-Zusammenbaus und der Verpackung der viralen DNA zu klären. Cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen von Virionen und die Aufklärung der L2-Lokalisation im Kapsid könnten Ansatzpunkte darüber liefern, wie die ersten 150 Aminosäuren in L2 das L1/L2-Verhältnis im Kapsid auf 30:1 beschränken [Baker *et al.* 1991; Trus *et al.* 1997].

4.3 Hsc70 wird für den Kerntransport von L2 benötigt

4.3.1 L2 interagiert mit Hsc70

Schon die Erkenntnis, dass L2 nur im Kern in VLPs eingebaut wird, ließ vermuten, dass die beiden Kapsidproteine im Cytoplasma an Proteine gebunden sind, die eine Interaktion von L2 mit L1 verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das konstitutiv exprimierte Chaperon Hsc70 als Interaktionspartner von L2 identifiziert werden. Hsc70

wird zusammen mit L2 in ND10 transportiert. Aber auch L1 und alle getesteten L2-Mutanten bewirkten die Umverteilung von Hsc70 aus dem Cytoplasma in den Kern. Hsc70 bindet an Proteine oder an noch wachsende Peptidketten, um eine korrekte Faltung der Proteine zu ermöglichen oder aber um frühzeitige Interaktionen mit anderen Proteinen zu verhindern.

Die Reaktionen von Chaperonen in der Zelle umfassen ein breites Aufgabengebiet und werden durch eine Vielzahl an Kochaperonen unterstützt und reguliert. Hip und Bag-1 sind zwei solcher Kochaperone, die die Affinität von Hsc70 zu seinen Substraten modulieren. Hip unterstützt die Hsc70-Interaktion mit seinem Substrat, indem es die ADP-gebundene Form von Hsc70 stabilisiert [Nollen *et al.* 2001]. Bag-1 dagegen wirkt als negativer Regulator und unterstützt den Austausch von ADP zu ATP. Dies führt zur Destabilisierung des Hsc70/Proteinpartner-Komplexes [Takayama *et al.* 1997; Nollen *et al.* 2000; Nollen *et al.* 2001]. Hsp40 ist ein Mitglied der J-Protein-Familie und erhöht die Aktivität von Hsc70 über eine Stimulierung der ATPase-Aktivität von Hsc70 [Minami *et al.* 1996; Laufen *et al.* 1999].

Die Relevanz und die Funktionalität der L2/Hsc70-Assoziation konnten mit Hilfe von Immunpräzipitationen und Kolokalisationsanalysen untermauert werden: Der Komplex zwischen L2 und Hsc70 umfasst neben Hsp40 ebenfalls die modulierenden Kochaperone Hip und Bag-1 [Florin *et al.* 2004]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion zwischen L2 und Hsc70 nicht die Konsequenz einer Überexpression der Kapsidproteine ist.

4.3.2 In Hsc70-Abwesenheit interagiert L2 mit Mikrotubuli

Unter MG132-Einfluss konnte man eine Umverteilung von Hsc70 innerhalb der Zellen beobachten. Das zuvor primär cytoplasmatisch lokalisierte Chaperon wurde nach Behandlung mit MG132 in die Nukleoli betroffener Zellen verschoben. Die Konzentration an cytoplasmatischem Hsc70 nahm drastisch ab. Unter diesen Bedingungen wurde L2 im Cytoplasma der Zellen zurückgehalten.

Dieser Effekt des Proteasomen-Inhibitors auf die Lokalisation von L2 war nur bei den L2-Konstrukten zu beobachten, die über den intakten C-Terminus des Proteins verfügten. Der Kerntransport von L1 unter diesen Versuchsbedingungen war nicht beeinträchtigt. Die Retention im Cytoplasma muss demnach durch den C-Terminus von L2 vermittelt werden. Die Wirkung von MG132 auf die L2-Lokalisation konnte teilweise

durch die Überexpression von GFP-fusioniertem Hsc70 aufgehoben werden. Ein Hsc70/GFP-Konstrukt, das keine ATPase-Aktivität zeigte, war dazu jedoch nicht in der Lage [Florin *et al.* 2004]. Die beobachtete Retention von L2 im Cytoplasma, wenn MG132 zugegeben wurde, kann somit spezifisch auf den cytoplasmatischen Verlust von Hsc70 und nicht auf einen der anderen pleiotropen Effekte des Proteasomen-Inhibitors zurückgeführt werden. Hsc70 spielt demnach eine essenzielle Rolle im Kerntransport von L2.

In diesem Zusammenhang kann die Aufgabe von Hsc70 u. a. sein, Interaktionen mit cytoplasmatischen Proteinen zu verhindern, vorhandene Kernlokalisierungssignale freizulegen oder auch eine bestimmte Faltung der betroffenen Proteine für den Kerntransport zu unterstützen. Eine mögliche Ursache dafür, dass L2 ohne Hsc70 nicht in den Kern transportiert wird, ergab sich bei Untersuchungen des Mikrotubuli-Netzwerkes. Nocodazol ist eine Substanz, die Tubulin-Stränge depolarisiert und dadurch die Mikrotubuli zerstört. Wurden L2-exprimierende Zellen vor der MG132-Zugabe mit diesem Reagenz behandelt, so konnte der Effekt der cytoplasmatischen L2-Retention verhindert werden. Durch Auflösung der Mikrotubuli fand der Kerntransport von L2 somit auch in Abwesenheit von cytoplasmatischem Hsc70 statt. Tatsächlich konnten weitere Arbeiten im Labor bestätigen, dass der C-Terminus von L2 mit Dynein interagiert (L. Florin, unveröffentlichte Daten). Dynein ist das Motorprotein, das für den retrograden Transport von Proteinen entlang Mikrotubuli verantwortlich ist. Dies weist darauf hin, dass der C-Terminus von L2 in Hsc70-Abwesenheit eine Dynein/Mikrotubuli-Assoziation aufweist und dass diese Interaktionsdomäne in L2 unter normalen Umständen von Hsc70 maskiert wird. Zusätzlich könnte eine solche L2/Hsc70-Interaktion im Cytoplasma die frühzeitige Wechselwirkung von L2 mit L1 verhindern.

Die Notwendigkeit einer Hsc70-Interaktion für den Kernimport konnte auch für andere virale Proteine, wie z. B. das SV40 T-Antigen gezeigt werden. Welche Mechanismen für die cytoplasmatische Retention dieser Proteine in Hsc70-Abwesenheit verantwortlich sind, wurde allerdings noch nicht genau untersucht.

Der C-Terminus von L2 scheint außerdem über eine Aktivität zu verfügen, die während der Virusmorphogenese in jedem Fall maskiert werden muss. Der Aminosäure-Abschnitt 445 bis 467 beinhaltet eine Sequenz, die essenziell für eine erfolgreiche Infektion ist, indem sie vermutlich die Endosomolyse der Virionen während der Infektion ermöglicht. Dieses Peptid depolarisiert Membranen und wirkt dadurch stark cytotoxisch

(N. Kämper, unveröffentlichte Daten). Während der viralen Produktionsphase, in der das L2-Protein in großen Mengen synthetisiert wird, muss diese Aktivität neutralisiert werden, da es sonst zum vorzeitigen Absterben der Zellen kommen würde, die die Virionen produzieren. Es scheint plausibel, dass Hsc70 auch diesen Bereich abdeckt, der mit der Mikrotubuli-Interaktionsdomäne offenbar überlappt.

4.3.3 Hsc70 wird in L1/L2-VLPs, nicht aber in Pseudovirionen eingebaut

Hsc70 bindet an kurze, hydrophobe Sequenzen, die auf der Oberfläche der Bindungsproteine liegen. Da alle L2-Mutanten zusammen mit Hsc70 im Zellkern detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass der C-Terminus von L2 nicht die einzige Bindungsstelle für Hsc70 darstellt. Daraus kann geschlossen werden, dass zwar mehrere Hsc70-Moleküle mit L2 assoziiert sind, jedoch die Hsc70-Bindung am C-Terminus von L2 essenziell für den Kerntransport des Proteins ist. Der unterschiedliche Charakter der verschiedenen L2/Hsc70-Interaktionen konnte durch die Untersuchungen des Hsc70-Einbaus in VLPs oder Pseudovirionen bestätigt werden. Die Versuche zeigten, dass VLPs, die nur aus L1 zusammengesetzt waren, kein Hsc70 enthielten, genau wie VLPs, die C-terminale Deletionsmutanten von L2 beinhalteten. Obwohl gemeinsamer Kerntransport von Hsc70 und L1 bzw. C-terminalen L2-Deletionsmutanten zu beobachten war, wurden das L1- und das über den N-Terminus von L2 assoziierte Hsc70 nicht in die Kapside eingebaut. Dagegen konnte in VLPs, die aus L1 und wtL2 bzw. N-terminalen L2-Deletionsmutanten aufgebaut waren, Hsc70 und das Kochaperon Hsp40 nachgewiesen werden. Die Hsc70-Assoziation ging verloren, wenn DNA in die Kapside eingebaut wurde und somit Pseudovirionen vorlagen.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass der C-Terminus des L2-Proteins die Komponente ist, durch die Hsc70 in VLPs eingebaut wird. Die Interaktion zwischen Hsc70 und L2 bzw. der C-terminalen L2-Domäne könnte somit nicht nur den Kerntransport gewährleisten, sondern auch an dem L2- und DNA-Einbau in Kapside beteiligt sein. Im Kern kann Hsc70 evtl. eine bestimmte Faltung des L2-Proteins unterstützen, die für die Interaktion von L2 mit Kapsomeren notwendig ist. Für HPV11 konnte gezeigt werden, dass gereinigte L1- und L2-Proteine, die nicht koexprimiert werden, nicht in der Lage sind, *in vitro* Komplexe zu bilden [Finnen *et al.* 2003]. Dies spricht für die Beteiligung von zellulären Faktoren für einen koordinierten Virus-Zusammenbau. Ebenso ist denkbar, dass durch die L2/Hsc70-Assoziation eine

vorzeitige Interaktion von L2 mit DNA verhindert wird. Die Bindung von Hsc70 an die Kapsidproteine ist auf jeden Fall transientser Natur und lässt eine wichtige Beteiligung des Chaperons während der Virusmorphogenese vermuten.

Auch Proteine anderer Viren sind mit Hsc70 assoziiert. Die Kapsidproteine von Polyomaviren interagieren mit Hsc70 und das Chaperon unterstützt einen geordneten Zusammenbau der Kapside *in vitro* [Cripe *et al.* 1995; Chromy *et al.* 2003]. Es wird vermutet, dass die Hsc70-Assoziation mit VP1, dem L1-Analogon von Polyomaviren, *in vivo* den frühzeitigen Zusammenbau von Pentameren verhindert. Von anderen Viren, wie dem Influenza-A-Virus, dem Vesicular-Stomatitis-Virus [Sagara and Kawai 1992] und HIV [Gurer *et al.* 2002], ist bekannt, dass die Chaperone sogar in die fertigen Virionen eingebaut werden. Welchen Zweck dieser Einbau hat, ist bisher unklar. Die häufige Notwendigkeit von Chaperonen in einem der vielen Schritte der Morphogenese von Viren zeigt aber deutlich, dass nicht nur zelluläre Mechanismen von dem Chaperon-System profitieren.

4.4 Ein Arbeitsmodell

Die im Rahmen dieser und vorheriger Arbeiten erzielten Erkenntnisse tragen dazu bei, die Abläufe während der HPV-Morphogenese detaillierter zu verstehen. Dies wird anhand eines Modells im Folgenden nochmals verdeutlicht (Abb. 34). Dabei wurden postulierte Funktionen von L2 während der Infektion mit einbezogen.

Bei der Expression der Kapsidproteine während später Infektionsphasen von HPV kommen NLS und NDLD von L2 zum Tragen (Abb. 34, linke Seite). Die Mikrotubuli-Interaktionsdomäne und die Region in L2, die die Endosomolyse unterstützt, werden durch die Hsc70-Assoziation maskiert (①). So wird während dieser Phase verhindert, dass L2 mit Mikrotubuli interagiert und Membranen destabilisiert. Der Zusammenbau von fünf L1-Molekülen zu Kapsomeren findet im Cytoplasma statt. Kapsomere und L2-Proteine werden unabhängig voneinander in den Kern transportiert, wobei beide mit Hsc70 assoziiert sind (②). Durch die Interaktion mit einem bisher unbekanntem Adaptermolekül lokalisiert L2 in ND10. Dort induziert L2 den Ausschluss von Sp100 aus den Kerndomänen und die verstärkte Akkumulation von Daxx in ND10. Die Kapsomere werden L2-abhängig ebenfalls in ND10 rekrutiert (③) und nach Beendigung der viralen Transkription und Replikation kommt es zum Zusammenbau der Virionen. Erst durch

die Verpackung der DNA in die Viren kommt es zum Ausschluss von Hsc70, das bis zu diesem Zeitpunkt mit dem C-Terminus von L2 assoziiert ist (④).

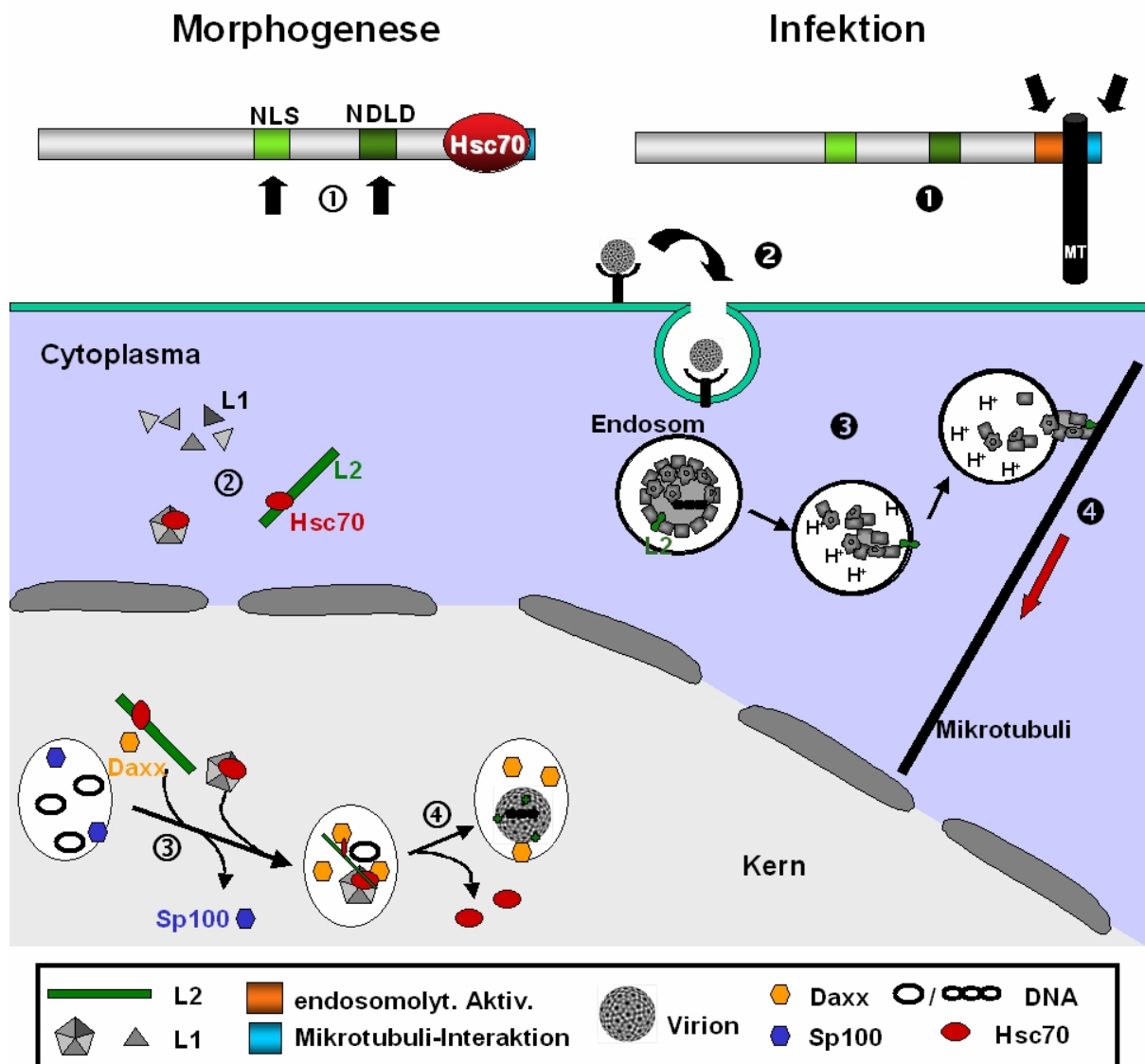


Abb. 34: Ein Arbeitsmodell: L2 während der Phase des Virionen-Zusammenbaus und während der Infektion

Die einzelnen Schritte innerhalb des Lebenszyklus' von HPV33 sind durchnummeriert und im Text erklärt.

Die Tatsache, dass Hsc70 nicht in Papillomviren eingebaut wird, unterstützt die durch das Labor um M. Sapp postulierten Funktionen von L2 bei der Infektion (Abb. 34, rechte Seite). Die freie Zugänglichkeit der endosomolytischen Aktivität und der Mikrotubuli-Interaktionsdomäne in L2 sind für eine erfolgreiche und effiziente Infektion notwendig (①). Nach der Bindung der Papillomviren an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, erfolgt die Aufnahme mittels Endocytose (②). Es konnte gezeigt werden, dass das

Verlassen der Endosomen (③) genau wie der retrograde Transport entlang der Mikrotubuli (④) essentiell für die HPV33-Infektion sind [Selinka *et al.* 2002; Selinka *et al.* 2003; Selinka and Sapp 2003] und dass diese Funktionen von L2 ausgeübt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die NDLD von L2 wie bei keinem bekannten Protein zuvor auf eine sehr kurze Sequenz von 22 Aminosäuren eingengt werden. Welcher Mechanismus für die ND10-Lokalisation von L2 verantwortlich ist, konnte dagegen nicht geklärt werden. Die Reorganisation der ND10, d. h. der Sp100-Ausschluss aus ND10 und die Rekrutierung von Daxx in ND10, kann nur durch dort lokalisierende L2-Mutanten durchgeführt werden. Dies spricht dafür, dass L2 direkt in ND10 die Veränderungen hervorruft und wahrscheinlich keine zusätzlichen Domänen in L2 daran beteiligt sind.

Zudem konnte gezeigt werden, dass das Kapsidprotein L2 über zwei unabhängige L1-Interaktionsdomänen verfügt. Diese am N- und C-Terminus gelegenen Regionen konnten nicht genau lokalisiert werden, und es ist durchaus wahrscheinlich, dass mehr als zwei L1-Interaktionsdomänen in L2 vorhanden sind. Eine weitere Analyse dieser L2-Regionen würde Einblicke in die unterschiedlichen Funktionen und evtl. in die Lage von L2 im Kapsid geben. Außerdem wurde bei den Untersuchungen von Kapsiden aus L1 und L2-150/467 klar, dass die ersten 150 Aminosäuren das L1/L2-Verhältnis in Kapsiden festlegen. Auch dieser Aspekt kann in weiteren Forschungen genutzt werden, um den Aufbau der HPV-Virionen besser zu verstehen.

Der Einsatz diverser L2-Mutanten und zweier L1-Proteine ergab, dass der Einbau von L2 nur im Kern infizierter Zellen stattfinden kann. Hierfür ist die Lokalisation der Kapsidproteine in ND10 nicht notwendig. Weiterführende Versuche müssen jedoch noch klären, inwieweit ND10 trotzdem unerlässlich für eine produktive Morphogenese sind.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass L1 und L2 mit dem zellulären Chaperon Hsc70 interagieren und der Kerntransport von L2 von dieser Assoziation abhängig ist. Hsc70 bindet an mehreren Stellen in L2, aber nur die Interaktion mit dem C-Terminus scheint essenziell für einen reibungslosen Kernimport zu sein. Ergebnisse dieser Arbeit lassen zudem vermuten, dass L2 mit dem Mikrotubuli-Netzwerk interagiert, falls kein cytoplasmatisches Hsc70 zur Verfügung steht. Das Chaperon könnte am C-Terminus eine Domäne maskieren, die anderenfalls mit Tubulinen bzw. Dynein in Wechselwirkung tritt. Hsc70 wird außerdem über die Interaktion mit dem C-Terminus von L2 in die Kapside eingebaut. Diese Interaktion geht jedoch verloren, wenn DNA in

das Kapsid verpackt wird. Auch diese Erkenntnisse bieten Grundlage für weitere Forschungsarbeiten. Ob die L2/Hsc70-Assoziation zudem verhindert, dass das Kapsidprotein frühzeitig mit L1 oder der viralen DNA interagiert, ist ebenso zu klären wie die Maskierung einer C-terminalen Domäne in L2, deren Funktion während der produktiven Virusphase verdeckt werden muss.

6 Literaturverzeichnis

- Adamson, A. L. and S. Kenney (2001). "Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies." J. Virol. **75**(5): 2388-99.
- Adzhubei, A. A. and M. J. Sternberg (1993). "Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins." J Mol Biol **229**(2): 472-93.
- Ahn, J. H., E. J. Brignole, 3rd and G. S. Hayward (1998). "Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML." Mol. Cell. Biol. **18**(8): 4899-913.
- Ahn, J. H. and G. S. Hayward (1997). "The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells." J. Virol. **71**(6): 4599-613.
- Alcalay, M., L. Tomassoni, E. Colombo, S. Stoldt, F. Grignani, M. Fagioli, L. Szekely, K. Helin and P. G. Pelicci (1998). "The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein." Mol Cell Biol **18**(2): 1084-93.
- Ausubel, F. M., R. Brent, F. K. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1994). "Current protocols in molecular biology", Vol. 1-3. John Wiley & Sons., New York.
- Ascoli, C. A. and G. G. Maul (1991). "Identification of a novel nuclear domain." J. Cell Biol. **112**(5): 785-95.
- Baker, T. S., W. W. Newcomb, N. H. Olson, L. M. Cowser, C. Olson and J. C. Brown (1991). "Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction." Biophys. J. **60**(6): 1445-56.
- Barouch, D. H. and S. C. Harrison (1994). "Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus." J Virol **68**(6): 3982-9.
- Bell, P., P. M. Lieberman and G. G. Maul (2000). "Lytic but not latent replication of Epstein-Barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins." J. Virol. **74**(24): 11800-10.
- Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon and P. S. Freemont (1996). "PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia." Oncogene **13**(5): 971-82.
- Boisvert, F. M., M. J. Hendzel and D. P. Bazett-Jones (2000). "Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA." J. Cell Biol. **148**(2): 283-92.
- Boisvert, F. M., M. J. Kruhlak, A. K. Box, M. J. Hendzel and D. P. Bazett-Jones (2001). "The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body." J Cell Biol **152**(5): 1099-106.

- Burkham, J., D. M. Coen, C. B. Hwang and S. K. Weller (2001). "Interactions of herpes simplex virus type 1 with ND10 and recruitment of PML to replication compartments." J. Virol. **75**(5): 2353-67.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares and I. Campos (2000). "To be or not to be in the nucleolus." Nat Cell Biol **2**(6): E107-12.
- Carvalho, T., J. S. Seeler, K. Ohman, P. Jordan, U. Pettersson, G. Akusjarvi, M. Carmo-Fonseca and A. Dejean (1995). "Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies." J. Cell Biol. **131**(1): 45-56.
- Chan, S. Y., H. Delius, A. L. Halpern and H. U. Bernard (1995). "Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy." J Virol **69**(5): 3074-83.
- Charette, S. J., J. N. Lavoie, H. Lambert and J. Landry (2000). "Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27." Mol. Cell. Biol. **20**(20): 7602-12.
- Chelbi-Alix, M. K. and H. de The (1999). "Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins." Oncogene **18**(4): 935-41.
- Chelbi-Alix, M. K., F. Quignon, L. Pelicano, M. H. Koken and H. de The (1998). "Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein." J Virol **72**(2): 1043-51.
- Chow, L. T. and T. R. Broker (1994). "Papillomavirus DNA replication." Intervirology **37**(3-4): 150-8.
- Chow, L. T. and T. R. Broker (1997). "In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences." Clin. Dermatol. **15**(2): 217-27.
- Chromy, L. R., J. M. Pipas and R. L. Garcea (2003). "Chaperone-mediated in vitro assembly of Polyomavirus capsids." PNAS USA **100**(18): 10477-82.
- Clertant, P. and I. Seif (1984). "A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins?" Nature **311**(5983): 276-9.
- Cole, S. T. and R. E. Streeck (1986). "Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer." J Virol **58**(3): 991-5.
- Conrad, M., V. J. Bubb and R. Schlegel (1993). "The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein." J Virol **67**(10): 6170-8.
- Cripe, T. P., S. E. Delos, P. A. Estes and R. L. Garcea (1995). "In vivo and in vitro association of hsc70 with polyomavirus capsid proteins." J Virol **69**(12): 7807-13.
- Day, P. M., R. B. Roden, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1998). "The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains." J. Virol. **72**(1): 142-50.
- de The, H., C. Chomienne, M. Lanotte, L. Degos and A. Dejean (1990). "The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus." Nature **347**(6293): 558-61.

- de Villiers, E. M. (1997). "Papillomavirus and HPV typing." Clin Dermatol **15**(2): 199-206.
- Delius, H. and B. Hofmann (1994). "Primer-directed sequencing of human papillomavirus types." Curr Top Microbiol Immunol **186**: 13-31.
- Delos, S. E., L. Montross, B. Moreland and R. L. Garcea (1993). "Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization." Virology **194**: 393-398.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean and L. Crawford (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." Nature **352**(6338): 824-7.
- Doorbar, J. and P. H. Gallimore (1987). "Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a." J. Virol. **61**(9): 2793-9.
- Doucas, V. (2000). "The promyelocytic (PML) nuclear compartment and transcription control." Biochem. Pharmacol. **60**(8): 1197-201.
- Doucas, V., A. M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M. D. Weitzman, R. M. Evans and G. G. Maul (1996). "Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure." Genes. Dev. **10**(2): 196-207.
- Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." Biochem J **356**(2): 297-310.
- Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay and P. S. Freemont (1999). "SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation." J. Cell Sci. **112**(3): 381-93.
- Dyck, J. A., G. G. Maul, W. H. Miller Jr., J. D. Chen, A. Kakizuka and R. M. Evans (1994). "A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein." Cell **76**: 333-343.
- Ecsedy, J. A., J. S. Michaelson and P. Leder (2003). "Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity." Mol Cell Biol **23**(3): 950-60.
- Emelyanov, A. V., C. R. Kovac, M. A. Sepulveda and B. K. Birshtein (2002). "The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells." J Biol Chem **277**(13): 11156-64.
- Everett, R. D. (2001). "DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies." Oncogene **20**(49): 7266-73.
- Everett, R. D., W. C. Earnshaw, A. F. Pluta, T. Sternsdorf, A. M. Ainsztein, M. Carmena, S. Ruchaud, W. L. Hsu and A. Orr (1999). "A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins." J. Cell Sci. **112**(20): 3443-54.
- Everett, R. D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, M. Kathoria and J. Parkinson (1998). "The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms." J. Virol. **72**(8): 6581-91.
- Everett, R. D. and G. G. Maul (1994). "HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML." EMBO J. **13**(21): 5062-9.

- Fagioli, M., M. Alcalay, P. P. Pandolfi, L. Venturini, A. Mencarelli, A. Simeone, D. Acampora, F. Grignani and P. G. Pelicci (1992). "Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms." Oncogene **7**(6): 1083-91.
- Favre, M. (1975). "Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses." J. Virol. **15**(5): 1239-47.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives and S. W. Lowe (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." Genes Dev **14**(16): 2015-27.
- Finnen, R. L., K. D. Erickson, X. S. Chen and R. L. Garcea (2003). "Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins." J Virol **77**(8): 4818-26.
- Fligge, C., F. Schäfer, H. C. Selinka, C. Sapp and M. Sapp (2001). "DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid." J Virol **75**(16): 7727-31.
- Florin, L. (2002). Zur Rolle der Kapsidproteine in der Morphogenese von Papillomviren: Funktionelle Domänen, intrazellulärer Transport und Reorganisation nukleärer Strukturen. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität.
- Florin, L., K. A. Becker, C. Sapp, C. Lambert, H. Sirma, M. Müller, R. E. Streeck and M. Sapp (2004). "Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires hsc70." J Virol **78**(11): 5546-53.
- Florin, L., C. Sapp, R. E. Streeck and M. Sapp (2002a). "Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins." J Virol **76**(19): 10009-14.
- Florin, L., F. Schafer, K. Sotlar, R. E. Streeck and M. Sapp (2002b). "Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2." Virology **295**(1): 97-107.
- Fogal, V., M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P. P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider and G. Del Sal (2000). "Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform." Embo J **19**(22): 6185-95.
- Forstova, J., N. Krausewicz, S. Wallace, A. J. Street, S. M. Dilworth, S. Beard and B. E. Griffin (1993). "Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus." J. Virol. **67**: 1405-1413.
- Fuchs, P. G. and H. Pfister (1994). "Transcription of papillomavirus genomes." Intervirology **37**(3-4): 159-67.
- Gall, J. G. (2000). "Cajal bodies: the first 100 years." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 273-300.
- Gissmann, L., H. Pfister and H. Zur-Hausen (1977). "Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates." Virology **76**(2): 569-80.
- Glotzer, J. B., M. Saltik, S. Chiocca, A. I. Michou, P. Moseley and M. Cotten (2000). "Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication." Nature **407**(6801): 207-11.
- Goddard, A. D., J. Borrow, P. S. Freemont and E. Solomon (1991). "Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia." Science **254**(5036): 1371-4.

- Gongora, R., R. P. Stephan, Z. Zhang and M. D. Cooper (2001). "An essential role for Daxx in the inhibition of B lymphopoiesis by type I interferons." Immunity **14**(6): 727-37.
- Görnemann, J., T. G. Hofmann, H. Will and M. Müller (2002). "Interaction of human papillomavirus type 16 L2 with cellular proteins: identification of novel nuclear body-associated proteins." Virology **303**(1): 69-78.
- Gottfredi, V. and C. Prives (2001). "P53 and PML: new partners in tumor suppression." Trends Cell. Biol. **11**(5): 184-7.
- Grötzinger, T., K. Jensen, H. H. Guldner, T. Sternsdorf, C. Szostecki, M. Schwab, L. Savelyeva, B. Reich and H. Will (1996). "A highly amplified mouse gene is homologous to the human interferon-responsive Sp100 gene encoding an autoantigen associated with nuclear dots." Mol Cell Biol **16**(3): 1150-6.
- Guldner, H. H., C. Szostecki, T. Grotzinger and H. Will (1992). "IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis." J. Immunol. **149**(12): 4067-73.
- Guldner, H. H., C. Szostecki, P. Schroder, U. Matschl, K. Jensen, C. Luders, H. Will and T. Sternsdorf (1999). "Splice variants of the nuclear dot-associated Sp100 protein contain homologies to HMG-1 and a human nuclear phosphoprotein-box motif." J Cell Sci **112**(5): 733-47.
- Gurer, C., A. Cimarelli and J. Luban (2002). "Specific incorporation of heat shock protein 70 family members into primate lentiviral virions." J Virol **76**(9): 4666-70.
- Hagensee, M. E., N. H. Olson, T. S. Baker and D. A. Galloway (1994). "Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids." J. Virol. **68**(7): 4503-5.
- Hagensee, M. E., N. Yaegashi and D. A. Galloway (1993). "Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins." J. Virol. **67**(1): 315-22.
- Harris, H. (1999). *The birth of the cell*. Yale University Press, New Haven.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-8.
- Hofmann, H., H. Sindre and T. Stamminger (2002). "Functional interaction between the pp71 protein of human cytomegalovirus and the PML-interacting protein human Daxx." J Virol **76**(11): 5769-83.
- Hofmann, K. J., J. C. Cook, J. G. Joyce, D. R. Brown, L. D. Schultz, H. A. George, M. Rosolowsky, K. H. Fife and K. U. Jansen (1995). "Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*." Virology **209**(2): 506-18.
- Hollenbach, A. D., J. E. Sublett, C. J. McPherson and G. Grosveld (1999). "The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx." EMBO J. **18**(13): 3702-11.
- Howley, P. M. (1996). *Papillomaviridae: The viruses and their replication*. In "Virology". (B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley). Vol 2: 2045-2076. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

- Howley, P. M. and D. R. Lowy (2001). Papillomaviruses and their replication. 4ed *In "Virology"*. (B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley). Vol 2: 2197-2229. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Ishii, N., A. Nakanishi, M. Yamada, M. H. Macalalad and H. Kasamatsu (1994). "Functional complementation of nuclear targeting-defective mutants of simian virus 40 structural proteins." *J Virol* **68**(12): 8209-16.
- Ishov, A. M. and G. G. Maul (1996). "The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition." *J. Cell Biol.* **134**(4): 815-26.
- Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, 3rd and G. G. Maul (1999). "PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1." *J. Cell Biol.* **147**(2): 221-34.
- Ishov, A. M., R. M. Stenberg and G. G. Maul (1997). "Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment." *J. Cell Biol.* **138**(1): 5-16.
- Ishov, A. M., O. V. Vladimirova and G. G. Maul (2002). "Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains." *J Virol* **76**(15): 7705-12.
- Ishov, A. M., O. V. Vladimirova and G. G. Maul (2004). "Heterochromatin and ND10 are cell cycle-regulated and phosphorylation-dependent alternate sites of the transcription repressor Daxx and the SWI/SNF protein ATRX." *JCS*(in press).
- Jang, M. S., S. W. Ryu and E. Kim (2002). "Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1." *Biochem Biophys Res Commun* **295**(2): 495-500.
- Jensen, K., C. Shiels and P. S. Freemont (2001). "PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif." *Oncogene* **20**(49): 7223-33.
- Jindal, S. and R. A. Young (1992). "Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins." *J Virol* **66**(9): 5357-62.
- Johne, R. and H. Müller (2004). "Nuclear localization of avian polyomavirus structural protein VP1 is a prerequisite for the formation of virus-like particles." *J Virol* **78**(2): 930-7.
- Kakizuka, A., W. H. Miller, Jr., K. Umesono, R. P. Warrell, Jr., S. R. Frankel, V. V. Murty, E. Dmitrovsky and R. M. Evans (1991). "Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML." *Cell* **66**(4): 663-74.
- Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani and E. T. Yeh (1998). "Identification of three major sentrinization sites in PML." *J Biol Chem* **273**(41): 26675-82.
- Kastner, P., A. Perez, Y. Lutz, C. Rochette-Egly, M. P. Gaub, B. Durand, M. Lanotte, R. Berger and P. Chambon (1992). "Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins." *Embo J* **11**(2): 629-42.
- Kawana, K., H. Yoshikawa, Y. Taketani, K. Yoshiike, and T. Kanda (1998). "In vitro construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids." *J. Virol.* **72**: 10298-10300.

- Kay, B. K., M. P. Williamson and M. Sudol (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." Faseb J **14**(2): 231-41.
- Kelly, C., R. Van Driel and G. W. Wilkinson (1995). "Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection." J Gen Virol **76**(11): 2887-93.
- Kentsis, A., R. E. Gordon and K. L. Borden (2002). "Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly." PNAS USA **99**(24): 15404-9.
- Kim, Y. H., C. Y. Choi, S. J. Lee, M. A. Conti and Y. Kim (1998). "Homeodomain-interacting protein kinases, a novel family of co-repressors for homeodomain transcription factors." J Biol Chem **273**(40): 25875-9.
- Kiriakidou, M., D. A. Driscoll, J. M. Lopez-Guisa and J. F. Strauss, 3rd (1997). "Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region." DNA Cell Biol **16**(11): 1289-98.
- Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1992). "Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic." PNAS USA **89**(24): 12180-4.
- Koken, M. H., G. Linares-Cruz, F. Quignon, A. Viron, M. K. Chelbi-Alix, J. Sobczak-Thepot, L. Juhlin, L. Degos, F. Calvo and H. de The (1995). "The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis." Oncogene **10**(7): 1315-24.
- Komly, C. A., F. Breitburd, O. Croissant and R. E. Streeck (1986). "The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens." J. Virol. **60**(2): 813-6.
- Korioth, F., C. Gieffers, G. G. Maul and J. Frey (1995). "Molecular characterization of NDP52, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment." J. Cell Biol. **130**(1): 1-13.
- Korioth, F., G. G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger and J. Frey (1996). "The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1." Exp. Cell Res. **229**(1): 155-8.
- Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P. P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont and H. de The (2001). "Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation." J Exp Med **193**(12): 1361-71.
- Lambert, P. F., N. Dostatni, A. A. McBride, M. Yaniv, P. M. Howley and B. Arcangioli (1989). "Functional analysis of the papilloma virus E2 trans-activator in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **3**(1): 38-48.
- Lamond, A. I. and W. C. Earnshaw (1998). "Structure and function in the nucleus." Science **280**(5363): 547-53.
- LaMorte, V. J., J. A. Dyck, R. L. Ochs and R. M. Evans (1998). "Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body." PNAS USA **95**(9): 4991-6.

- Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein and B. Bukau (1999). "Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones." PNAS USA **96**(10): 5452-7.
- Leder, C., J. A. Kleinschmidt, C. Wiethe and M. Müller (2001). "Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes." J Virol **75**(19): 9201-9.
- Lehembre, F., S. Muller, P. P. Pandolfi and A. Dejean (2001). "Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML." Oncogene **20**(1): 1-9.
- Lehming, N., A. Le Saux, J. Schuller and M. Ptashne (1998). "Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex." PNAS USA **95**(13): 7322-6.
- Lewis, M. J. and H. R. Pelham (1985). "Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein." Embo J **4**(12): 3137-43.
- Li, H. and J. D. Chen (2000). "PML and the oncogenic nuclear domains in regulating transcriptional repression." Curr. Opin. Cell Biol. **12**(5): 641-4.
- Li, H., C. Leo, J. Zhu, X. Wu, J. O'Neil, E. J. Park and J. D. Chen (2000a). "Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML." Mol. Cell. Biol. **20**(5): 1784-96.
- Li, M., P. Beard, P. A. Estes, M. K. Lyon and R. L. Garcea (1998). "Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly." J. Virol. **72**(3): 2160-7.
- Li, M., T. P. Cripe, P. A. Estes, M. K. Lyon, R. C. Rose and R. L. Garcea (1997). "Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia coli: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly." J. Virol. **71**(4): 2988-95.
- Li, R. and M. R. Botchan (1993). "The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication." Cell **73**(6): 1207-21.
- Li, R., H. Pei, D. K. Watson and T. S. Papas (2000b). "EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes." Oncogene **19**(6): 745-53.
- Lin, R. J., T. Sternsdorf, M. Tini and R. M. Evans (2001). "Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia." Oncogene **20**(49): 7204-15.
- Liu, J. S., S. R. Kuo, A. M. Makhov, D. M. Cyr, J. D. Griffith, T. R. Broker and L. T. Chow (1998). "Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication." J Biol Chem **273**(46): 30704-12.
- Macejak, D. G. and P. Sarnow (1992). "Association of heat shock protein 70 with enterovirus capsid precursor P1 in infected human cells." J Virol **66**(3): 1520-7.
- Mantovani, F. and L. Banks (1999). "The interaction between p53 and papillomaviruses." Semin Cancer Biol **9**(6): 387-95.
- Matera, A. G. (1999). "Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space." Trends Cell Biol **9**(8): 302-9.

- Maul, G. G. (1998). "Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication." Bioessays **20**(8): 660-7.
- Maul, G. G., H. H. Guldner and J. G. Spivack (1993). "Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0)." J. Gen. Virol. **74**(12): 2679-90.
- Maul, G. G., D. Negorev, P. Bell and A. M. Ishov (2000). "Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs." J. Struct. Biol. **129**(2-3): 278-87.
- Maul, G. G., E. Yu, A. M. Ishov and A. L. Epstein (1995). "Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress." J. Cell. Biochem. **59**(4): 498-513.
- Mayer, M. P. and B. Bukau (1998). "Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action." Biol Chem **379**(3): 261-8.
- Meyers, C., M. G. Frattini, J. B. Hudson and L. A. Laimins (1992). "Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation." Science **257**(5072): 971-3.
- Michaelson, J. S., D. Bader, F. Kuo, C. Kozak and P. Leder (1999). "Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development." Genes Dev **13**(15): 1918-23.
- Minami, Y., J. Hohfeld, K. Ohtsuka and F. U. Hartl (1996). "Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40." J Biol Chem **271**(32): 19617-24.
- Misteli, T. (2001). "Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression." Science **291**(5505): 843-7.
- Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson and M. R. Botchan (1990). "Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator." Science **250**(4988): 1694-9.
- Moilanen, A. M., U. Karvonen, H. Poukka, O. A. Janne and J. J. Palvimo (1998). "Activation of androgen receptor function by a novel nuclear protein kinase." Mol Biol Cell **9**(9): 2527-43.
- Möller, A., H. Sirma, T. G. Hofmann, H. Staeger, E. Gresko, K. S. Ludi, E. Klimczak, W. Droge, H. Will and M. L. Schmitz (2003). "Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression." Oncogene **22**(54): 8731-7.
- Moss, B., O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander and T. R. Fuerst (1990). "Product review. New mammalian expression vectors." Nature **348**(6296): 91-2.
- Mu, Z. M., K. V. Chin, J. H. Liu, G. Lozano and K. S. Chang (1994). "PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia." Mol Cell Biol **14**(10): 6858-67.
- Müller, M., L. Gissmann, R. J. Cristiano, X. Y. Sun, I. H. Frazer, A. B. Jenson, A. Alonso, H. Zentgraf and J. Zhou (1995). "Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species." J. Virol. **69**(2): 948-54.
- Muller, S. and A. Dejean (1999). "Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption." J. Virol. **73**(6): 5137-43.

- Muller, S., M. J. Matunis and A. Dejean (1998). "Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus." Embo J **17**(1): 61-70.
- Naka, K., K. Ikeda and N. Motoyama (2002). "Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein." Biochem Biophys Res Commun **299**(5): 863-71.
- Neff, N. F., N. A. Ellis, T. Z. Ye, J. Noonan, K. Huang, M. Sanz and M. Proytcheva (1999). "The DNA helicase activity of BLM is necessary for the correction of the genomic instability of bloom syndrome cells." Mol Biol Cell **10**(3): 665-76.
- Nefkens, I., D. G. Negorev, A. M. Ishov, J. S. Michaelson, E. T. Yeh, R. M. Tanguay, W. E. Muller and G. G. Maul (2003). "Heat shock and Cd²⁺ exposure regulate PML and Daxx release from ND10 by independent mechanisms that modify the induction of heat-shock proteins 70 and 25 differently." J Cell Sci **116**(3): 513-24.
- Negorev, D., A. M. Ishov and G. G. Maul (2001). "Evidence for separate ND10-binding and homo-oligomerization domains of Sp100." J. Cell Sci. **114**(1): 59-68.
- Negorev, D. and G. G. Maul (2001). "Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot." Oncogene **20**(49): 7234-42.
- Niewiarowska, J., J. C. D'Halluin and M. T. Belin (1992). "Adenovirus capsid proteins interact with HSP70 proteins after penetration in human or rodent cells." Exp Cell Res **201**(2): 408-16.
- Nollen, E. A., J. F. Brunsting, J. Song, H. H. Kampinga and R. I. Morimoto (2000). "Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity." Mol Cell Biol **20**(3): 1083-8.
- Nollen, E. A., A. E. Kabakov, J. F. Brunsting, B. Kanon, J. Hohfeld and H. H. Kampinga (2001). "Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1." J Biol Chem **276**(7): 4677-82.
- Okun, M. M., P. M. Day, H. L. Greenstone, F. P. Booy, D. R. Lowy, J. T. Schiller and R. B. Roden (2001). "L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation." J. Virol. **75**(9): 4332-42.
- Olson, M. O., M. Dunder and A. Szebeni (2000). "The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities." Trends Cell Biol **10**(5): 189-96.
- Paintsil, J., M. Müller, M. Picken, L. Gissmann and J. Zhou (1996). "Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation." Virology **223**(1): 238-44.
- Park, P., W. Copeland, L. Yang, T. Wang, M. R. Botchan and I. J. Mohr (1994). "The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase." PNAS USA **91**(18): 8700-4.
- Parkinson, J. and R. D. Everett (2000). "Alphaherpesvirus proteins related to herpes simplex virus type 1 ICP0 affect cellular structures and proteins." J. Virol. **74**(21): 10006-17.
- Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P. P. Pandolfi and P. G. Pelicci (2000). "PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras." Nature **406**(6792): 207-10.

- Perlman, R., W. P. Schiemann, M. W. Brooks, H. F. Lodish and R. A. Weinberg (2001). "TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation." Nat Cell Biol **3**(8): 708-14.
- Pluta, A. F., W. C. Earnshaw and I. G. Goldberg (1998). "Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death." J Cell Sci **111**(14): 2029-41.
- Quignon, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J. C. Ameisen and H. de The (1998). "PML induces a novel caspase-independent death process." Nat. Genet. **20**(3): 259-65.
- Reymond, A., G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P. G. Pelicci and A. Ballabio (2001). "The tripartite motif family identifies cell compartments." Embo J **20**(9): 2140-51.
- Roberts, S., I. Ashmole, G. D. Johnson, J. W. Kreider and P. H. Gallimore (1993). "Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells." Virology **197**(1): 176-87.
- Roberts, S., M. L. Hillman, G. L. Knight and P. H. Gallimore (2003). "The ND10 component promyelocytic leukemia protein relocates to human papillomavirus type 1 E4 intranuclear inclusion bodies in cultured keratinocytes and in warts." J Virol **77**(1): 673-84.
- Roden, R. B., H. L. Greenstone, R. Kirnbauer, F. P. Booy, J. Jessie, D. R. Lowy and J. T. Schiller (1996). "In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype." J. Virol. **70**(9): 5875-83.
- Rose, R. C., W. Bonnez, R. C. Reichman and R. L. Garcea (1993). "Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles." J. Virol. **67**(4): 1936-1944.
- Ruggero, D., Z. G. Wang and P. P. Pandolfi (2000). "The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer." Bioessays **22**(9): 827-835.
- Sagara, J. and A. Kawai (1992). "Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion." Virology **190**(2): 845-8.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saphire, A. C., T. Guan, E. C. Schirmer, G. R. Nemerow and L. Gerace (2000). "Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70." J Biol Chem **275**(6): 4298-304.
- Sapp, M., C. Fligge, I. Petzak, J. R. Harris and R. E. Streeck (1998). "Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines." J. Virol. **72**(7): 6186-6189.
- Sapp, M., C. Volpers, M. Müller and R. E. Streeck (1995). "Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles." J. Gen. Virol. **76**(9): 2407-2412.

- Sasawaga, T., P. Pushko, G. Steers, S. E. Gschmeissner, M. A. N. Hajibagheri, J. Finch, L. Crawford and M. Tommasino (1995). "Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Virology* **206**: 126-135.
- Scheer, U. and R. Hock (1999). "Structure and function of the nucleolus." *Curr Opin Cell Biol* **11**(3): 385-90.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine and P. M. Howley (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-36.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." *Embo J* **14**(24): 6218-28.
- Seeler, J. S. and A. Dejean (1999). "The PML nuclear bodies: actors or extras?" *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**(3): 362-367.
- Seeler, J. S., A. Marchio, R. Losson, J. M. Desterro, R. T. Hay, P. Chambon and A. Dejean (2001). "Common properties of nuclear body protein sp100 and tif1alpha chromatin factor: role of sumo modification." *Mol. Cell. Biol.* **21**(10): 3314-3324.
- Seeler, J. S., A. Marchio, D. Sitterlin, C. Transy and A. Dejean (1998). "Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment." *PNAS USA* **95**(13): 7316-7321.
- Selinka, H. C., T. Giroglou, T. Nowak, N. D. Christensen and M. Sapp (2003). "Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations." *J Virol* **77**(24): 12961-7.
- Selinka, H. C., T. Giroglou and M. Sapp (2002). "Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions." *Virology* **299**(2): 279-287.
- Selinka, H. C. and M. Sapp (2003). "Papillomavirus/cell-interactions initiating the infectious entry pathway." *Papillomavirus Report* **14**: 259-265.
- Seo, Y. S., F. Muller, M. Lusky and J. Hurwitz (1993). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication." *PNAS USA* **90**(2): 702-706.
- Shah, K. V. and P. M. Howley (1996). Papillomaviruses. In "*Virology*". B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. Lippincott-Raven Publ., Philadelphia.: 2077-2109.
- Spector, D. L. (1993). "Macromolecular domains within the cell nucleus." *Annu Rev Cell Biol* **9**: 265-315.
- Stauffer, Y., K. Raj, K. Masternak and P. Beard (1998). "Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions." *J. Mol. Biol.* **283**(3): 529-536.
- Sternsdorf, T., T. Grotzinger, K. Jensen and H. Will (1997a). "Nuclear dots: actors on many stages." *Immunobiology* **198**(1-3): 307-331.
- Sternsdorf, T., K. Jensen, B. Reich and H. Will (1999). "The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers." *J Biol Chem* **274**(18): 12555-66.

- Sternsdorf, T., K. Jensen and H. Will (1997b). "Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1." J Cell Biol **139**(7): 1621-34.
- Sternsdorf, T., K. Jensen, D. Zuchner and H. Will (1997c). "Cellular localization, expression, and structure of the nuclear dot protein 52." J Cell Biol **138**(2): 435-48.
- Stoler, M. H. (2000). "Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis." Int J Gynecol Pathol **19**(1): 16-28.
- Stoler, M. H., A. Whitbeck, S. M. Wolinsky, T. R. Broker, L. T. Chow, M. K. Howett and J. W. Kreider (1990). "Infectious cycle of human papillomavirus type 11 in human foreskin xenografts in nude mice." J Virol **64**(7): 3310-8.
- Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers and D. J. McCance (1993). "The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes." J Virol **67**(8): 4521-32.
- Sullivan, C. S., J. D. Tremblay, S. W. Fewell, J. A. Lewis, J. L. Brodsky and J. M. Pipas (2000). "Species-specific elements in the large T-antigen J domain are required for cellular transformation and DNA replication by simian virus 40." Mol Cell Biol **20**(15): 5749-57.
- Sun, X. Y., I. Frazer, M. Muller, L. Gissmann and J. Zhou (1995). "Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein." Virology **213**(2): 321-327.
- Swindle, C. S., N. Zou, B. A. Van Tine, G. M. Shaw, J. A. Engler and L. T. Chow (1999). "Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system." J. Virol. **73**(2): 1001-1009.
- Szosteki, C. (1991). Studien zur Struktur, Expression und Funktion des nukleären Sp100-Autoantigens und Analyse der humoralen Immunantwort. München, Ludwig-Maximilians-Universität.
- Szosteki, C., H. H. Guldner, H. J. Netter and H. Will (1990). "Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis." J. Immunol. **145**(12): 4338-4347.
- Takayama, S., D. N. Bimston, S. Matsuzawa, B. C. Freeman, C. Aime-Sempe, Z. Xie, R. I. Morimoto and J. C. Reed (1997). "BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70." Embo J **16**(16): 4887-96.
- Tang, Q., P. Bell, P. Tegtmeyer and G. G. Maul (2000). "Replication but not transcription of simian virus 40 DNA is dependent on nuclear domain 10." J. Virol. **74**(20): 9694-9700.
- Terris, B., V. Baldin, S. Dubois, C. Degott, J. F. Flejou, D. Henin and A. Dejean (1995). "PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation." Cancer Res **55**(7): 1590-7.
- Torii, S., D. A. Egan, R. A. Evans and J. C. Reed (1999). "Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs)." EMBO J. **18**(21): 6037-6049.

- Touze, A. and P. Coursaget (1998). "In vitro gene transfer using human papillomavirus-like particles." Nucl. Acids Res. **26**(5): 1317-1323.
- Trus, B. L., R. B. Roden, H. L. Greenstone, M. Vrhel, J. T. Schiller and F. P. Booy (1997). "Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution." Nat. Struct. Biol. **4**(5): 413-420.
- Unckell, F., R. E. Streeck and M. Sapp (1997). "Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33." J. Virol. **71**(4): 2934-2939.
- Ustav, M. and A. Stenlund (1991). "Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames." EMBO J. **10**(2): 449-457.
- Vallian, S., J. A. Gaken, I. D. Trayner, E. B. Gingold, T. Kouzarides, K. S. Chang and F. Farzaneh (1997). "Transcriptional repression by the promyelocytic leukemia protein, PML." Exp. Cell Res. **237**(2): 371-382.
- Volpers, C., M. Sapp, P. J. Snijders, J. M. Walboomers and R. E. Streeck (1995). "Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal antibodies to the minor capsid protein L2." J. Gen. Virol. **76**(11): 2661-2667.
- Volpers, C., P. Schirmacher, R. E. Streeck and M. Sapp (1994). "Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells." Virology **200**(2): 504-512.
- Wang, Z. G., D. Ruggero, S. Ronchetti, S. Zhong, M. Gaboli, R. Rivi and P. P. Pandolfi (1998). "PML is essential for multiple apoptotic pathways." Nat. Genet. **20**(3): 266-272.
- Wasylyk, C., S. E. Schlumberger, P. Criqui-Filipe and B. Wasylyk (2002). "Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity." Mol Cell Biol **22**(8): 2687-702.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonseca, A. Lamond and A. Dejean (1994). "Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells." Cell **76**(2): 345-356.
- White, W. I., S. D. Wilson, W. Bonnez, R. C. Rose, S. Koenig and J. A. Suzich (1998). "In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human papillomavirus type 16." J. Virol. **72**: 959-964.
- Wiesmeijer, K., C. Molenaar, I. M. Bekeer, H. J. Tanke and R. W. Dirks (2002). "Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not." J Struct Biol **140**(1-3): 180-8.
- Wilkinson, G. W., C. Kelly, J. H. Sinclair and C. Rickards (1998). "Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product." J. Gen. Virol. **79**(5): 1233-1245.
- Wu, H., D. F. Ceccarelli and L. Frappier (2000). "The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1." EMBO Rep **1**(2): 140-4.

-
- Wu, W. S., S. Vallian, E. Seto, W. M. Yang, D. Edmondson, S. Roth and K. S. Chang (2001). "The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases." Mol. Cell. Biol. **21**(7): 2259-2268.
- Xie, K., E. J. Lambie and M. Snyder (1993). "Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus." Mol Cell Biol **13**(10): 6170-9.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang and D. Baltimore (1997). "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis." Cell **89**(7): 1067-76.
- Zerfass, K., A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein and P. Jansen-Durr (1995). "Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation." J Virol **69**(10): 6389-99.
- Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean and P. P. Pandolfi (2000a). "Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation." Blood **95**(9): 2748-2752.
- Zhong, S., P. Salomoni, S. Ronchetti, A. Guo, D. Ruggero and P. P. Pandolfi (2000b). "Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis." J. Exp. Med. **191**(4): 631-640.
- Zhou, J., X. Y. Sun, K. Louis and I. H. Frazer (1994). "Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence." J. Virol. **68**(2): 619-625.
- Zhou, J., X. Y. Sun, D. J. Stenzel and I. H. Frazer (1991). "Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles." Virology **185**(1): 251-257.
- zur Hausen, H. (1999). "Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes." Semin Cancer Biol **9**(6): 405-11.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
AK	Antikörper
APL	akute promyelocytische Leukämie
AS	Aminosäure
BI	Brechungsindex
bp	Basenpaare
BPV	Rinder-Papillomvirus (<i>bovine papillomavirus</i>)
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
CB	Cajal-Körper (<i>cajal bodies</i>)
CBP	CREB bindendes Protein (<i>CREB binding protein</i>)
CMV	Cytomegalovirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DMEM ⁺	Dulbecco`s modified Eagle Medium mit 10% FCS und 1% Antibiotikum
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
Dnase	Desoxyribonuklease
E	früh (<i>early</i>) exprimiertes Protein
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethyl-diamin-tetra-essigsäure
EGTA	Ethylen-glykolaminoethylether-tetra-acetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EM	Elektronenmikroskop
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Guanin
GFP	Grün-floureszierendes Protein (<i>green flourescent protein</i>)
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPV	humanes Papillomvirus/humane Papillomviren
HSR	<i>homogeneously staining region</i>
HSV	Herpes Simplex Virus

IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
Kb	Kilobasen
KB	Kremer-Körper (<i>Kremer bodies</i>)
KD	Kilodalton
L	spät (<i>late</i>) exprimiertes Protein
mAk	monoklonaler Antikörper
ME	Mercaptoethanol
MOI	Zahl der Infektion (Infektionseinheiten/Zelle; <i>multiplicity of infection</i>)
NC	Nitrocellulose
NCR	nichtkodierende Region (<i>non-coding region</i>)
ND10	<i>nuclear domain 10</i>
NLDL	ND10-Lokalisationsdomäne
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
NP40	Nonidet-40
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper bzw. Serum
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS/EDTA	PBS mit 2,5 mM EDTA Endkonzentration
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFU	Infektionseinheiten (<i>plaque forming units</i>)
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
PODs	PML onogenic domains
POX	<i>Peroxidase</i>
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressor
PV	Pseudovirionen
RAR	Retinsäurerezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations/rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SFC	Sleiß-Faktor-Kompartiment
S-Phase	Synthese-Phase
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SV40	(Affen)Simian Virus 40
Std.	Stunde(n)
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Trp	Trypsin
UV	Ultraviolett
vac	Vacciniavirus
VLP	virusähnlicher Partikel (<i>virus-like particle</i>)
VTF7-3	Vaccinia-Helfervirus
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
„6well“	6-Lochplatte

Hiermit versichere ich, Katrin Anne Becker, gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben habe.

Mainz, den _____

(Katrin Becker)